

Aus den Forschungslaboratorien
der Schering AG, Berlin/Bergkamen

**Insulinrezeptoren an Fettzellen:
Bindungseigenschaften modifizierter Insuline
und Untersuchungen der Insulinbindung
bei einer durch Gestagen induzierten Insulinresistenz bei der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von
Dipl.-Biol. Maria Krauth
aus Varkaus/Finnland

1976

Aus den Forschungslaboratorien
der Schering AG, Berlin/Bergkamen

INSULINREZEPTOREN AN FETTZELLEN:
BINDUNGSEIGENSCHAFTEN MODIFIZIERTER INSULINE UND
UNTERSUCHUNGEN DER INSULINBINDUNG BEI EINER DURCH
GESTAGEN INDUZIERTEN INSULINRESISTENZ BEI DER RATTE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

von

Dipl.-Biol. Maria Krauth
aus Varkaus/Finnland



Erster Referent: Prof. Dr. K. Graszynski
Zweiter Referent: Prof. Dr. Dr. E. Gerhards

Tag der Promotion: 3. November 1976

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Experimenteller Teil	8
2.1 Materialien	8
2.1.1 Hormone	8
2.1.2 Sonstige Substanzen	10
2.2 Tiermaterial und Behandlung	11
2.2.1 Ratten	11
2.2.2 Andere Spezies	14
2.3 Methoden	15
2.3.1 Insulinrezeptoren an Fettzellen	15
2.3.2 Insulinrezeptoren an Lymphozyten	21
2.3.3 Intravenöser Glukosetoleranztest	24
2.3.4 Intravenöser Insulinbelastungstest	25
2.3.5 Glukosebestimmung	25
2.3.6 Bestimmung der Insulinkonzentration	26
2.3.7 Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Antikörper	27
2.3.8 Messung der insulinstimulierten Glukose-Oxydation am Fettgewebe	28
2.3.9 Messung der Radioaktivität	30
2.4 Statistische Auswertung	30
3 Ergebnisse	33
3.1 Ausarbeitung der Versuchsbedingungen	33
3.1.1 Insulinrezeptoren an Fettzellen	33
3.1.2 Insulinrezeptoren an Lymphozyten	47

	Seite
3.2	Prüfung einiger neuer Insulinderivate auf Bindung an den Fettzellrezeptor, an Antikörper sowie auf biologische Aktivität in vitro und in vivo
	50
3.3	Insulinbindung an Fettzellen bei der Fettsucht, nach Behandlung mit Clomegestonacetat, Cyproteronacetat und Insulin
	57
3.3.1	Fettsucht bei der Maus
	57
3.3.2	Behandlung mit Clomegestonacetat
	61
3.3.3	Behandlung mit Cyproteronacetat
	69
3.3.4	Behandlung mit Insulin
	74
4	Diskussion
	77
4.1	Methodische Probleme
	77
4.2	Characterisierung einiger neuer Insulinderivate
	83
4.3	Insulinrezeptoren bei einigen Formen der Insulinresistenz
	88
5	Zusammenfassung
	97
6	Literaturverzeichnis
	99
7	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen
	116

1 Einleitung

Die Wechselwirkung eines Hormons mit seinem spezifischen Rezeptor stellt einen der ersten Schritte in einer Kette von Ereignissen dar, die zur Manifestation eines hormonabhängigen physiologischen Effektes führt. Das Rezeptormolekül hat zwei Funktionen zu erfüllen. Auf der einen Seite soll es das Hormon mit hoher Spezifität erkennen. Andererseits müssen durch das Rezeptormolekül direkt oder indirekt Umsetzungen in der Zelle in Gang gebracht werden, die für das jeweilige Hormon und einen bestimmten Zelltyp charakteristisch sind.

Die Hormonrezeptoren lassen sich prinzipiell in zwei Klassen einteilen. Für die Steroidhormone sowie für Thyroxin und Trijodthyronin sind Rezeptoren im Zytoplasma lokalisiert (JENSEN und JACOBSON, 1962; RASPE, 1970; LÜBKE et al., 1976). Dagegen sind die Rezeptoren der Peptidhormone, der Katecholamine und der Prostaglandine an der Zellmembran solcher Zellen gefunden worden, die auf einen entsprechenden hormonalen Stimulus ansprechen (ROTH, 1973; CUATRECASAS, 1974a; POWELL et al., 1974). Eine Reihe von Untersuchungen haben ergeben, daß auch Insulin als typisches Peptidhormon seine physiologischen Wirkungen über einen Membranrezeptor ausübt.

Erste Hinweise, daß Insulin über die Zellmembran wirkt, wurden durch Messung des insulinstimulierten Glukosetransports aus dem Extrazellulärraum in Muskel- oder Fettgewebe von Ratten erbracht (KIPNIS, 1959; PARK et al., 1961; CROFFORD et al., 1965a, b).

In den ersten Arbeiten mit isolierten Fettzellen konnte dies außer für den Glukosetransport auch für die antilipolytische Wirkung des Insulins nachgewiesen werden (RODBELL, 1966a, b, c, 1967). Später wurde gezeigt, daß Insulin auch dann noch wirksam ist, wenn es in kovalenter Bindung an Dextran- oder Agarosepolymere geknüpft ist. Diese Moleküle sind zu groß um in die Zelle eindringen zu können (CUATRECASAS, 1969). Dennoch zeigen sie mehrere typische Insulin-effekte sowohl in vivo als auch in vitro (BLATT und KIM, 1971; ARMSTRONG, 1972; SUZUKI et al., 1972).

FREYCHET et al. (1971a) gelangen es mit dem ^{125}Jod -Isotop bei Erhaltung der vollen biologischen Wirksamkeit radioaktiv markiertes Insulin herzustellen. Gleichzeitig wurden Methoden entwickelt, die eine genauere Erfassung von Rezeptoren erlaubten (vgl. ROTH, 1973). Untersuchungen, in denen die Insulinbindung in verschiedenen Zellfraktionen geprüft wurde, zeigten erwartungsgemäß, daß Insulinrezeptoren an der Zellmembran vorkommen (CUATRECASAS, 1972; FREYCHET et al., 1972a; FORGUE und FREYCHET, 1975). Keiner der Autoren konnte eine Insulinbindung an anderen Zellorganellen bzw. Zellfraktionen finden. Diese Befunde stehen im Einklang mit elektronenmikroskopischen Beobachtungen an Fettzellen und Fettzellmembranen, die mit radioaktiv markiertem Insulin oder mit Insulinantikörpern durchgeführt wurden. Dabei konnte festgestellt werden, daß Insulin ausschließlich an der äußeren Zellmembran haftet (JARRETT und SMITH, 1974; SIESS et al., 1974).

Das proteolytische Enzym Trypsin zerstört das Rezeptormolekül in mehreren Geweben. Die Einwirkung von

Trypsin führte an Fettzellen zu einem Verlust mehrerer Insulineffekte in vitro wie die antilipolytische Wirkung, die Steigerung der Glukose-Oxydation oder die Herabsetzung der Menge an zyklischem 3'5'-Adenosinmonophosphat, c-AMP (FAIN und LOKEN, 1969; CZECH und FAIN, 1970; CUATRECASAS, 1971c; KONO und BARHAM, 1971a, b, 1972; GAVIN et al., 1973; HAOUR und BERTRAND, 1974; JERUMS und GALTON, 1974; O'KEEFE und CUATRECASAS, 1974).

Insulin besitzt keine Organspezifität, vielmehr sind viele Stoffwechselvorgänge in den verschiedensten Organen und Geweben durch Insulin stimulierbar. In Übereinstimmung dazu sind Insulinrezeptoren gefunden worden an typischen insulinempfindlichen Geweben wie Leber, Herz- und Skelettmuskel, am Fettgewebe, aber auch an Zellen und Organen, von denen nicht bekannt ist ob bzw. in welcher Weise Insulin ihren Metabolismus beeinflußt (FREYCHET et al., 1971a; CUATRECASAS, 1971a; GAVIN et al., 1972c; MARSHALL et al., 1974; POSNER et al., 1974b; FORGUE und FREYCHET, 1975; HOLLENBERG und CUATRECASAS, 1975; OLEFSKY et al., 1976). Hierzu gehören beispielsweise Lymphozyten und in geringerem Maße Erythrozyten, bei denen bisher nicht geklärt werden konnte, ob sie in Gegenwart von Insulin mit einer entsprechenden hormoncharakteristischen Reaktion antworten. Sie haben den Vorteil, aus dem lebendigen Tier leicht zugänglich zu sein.

Nachdem erkannt wurde, daß Insulin über einen membrangebundenen Rezeptor wirkt, gewannen die Insulinbindungsstellen zunehmend an Interesse zur Beurteilung unterschiedlichster Fragestellungen. Für die vorliegende Arbeit wurde eine von GAMTELTOFT und

GLIEMANN (1972) eingeführte Methode zur Messung der Insulinrezeptoren an Fettzellen übernommen. Versuchsweise wurden Insulinrezeptoren auch an Lymphozyten gemessen.

Die Methode der Rezeptormessung an Fettzellen wurde zunächst zur Analyse der Bindungseigenschaften einiger neuer Insulinderivate angewandt. Als Ergänzung dazu wurde die biologischen Eigenschaften dieser Verbindungen und deren Bindung an Antikörper gemessen. Bei der Feststellung der biologischen Wirkung des Insulins oder dessen Derivate in vivo durch die Blutzuckersenkung bei der Ratte oder beim Kaninchen müssen Faktoren wie Verteilung und Abbau des Insulins im Organismus beachtet werden. Für die biologische Charakterisierung in vitro eignet sich besonders die Glukoseverwertung von Fettgewebe von Ratten. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, daß eine Metabolisierung des Insulins weitgehend auszuschließen ist. Die Bindung eines Insulinderivats an Antikörper gestattet im Gegensatz zur Messung der Glukose-Oxydation am Fettgewebe eine Aussage zur Struktur - Aktivitätsbeziehungen am Insulinmolekül, die unabhängig vom biologischen Rezeptor ist. Aus der Literatur war bereits bekannt, daß eine sehr befriedigende Parallelität zwischen biologischer Aktivität und Rezeptorbindung für Substanzen besteht, die mit Insulin strukturell verwandt sind. Typische Beispiele in der Gruppe der wenig aktiven oder inaktiven Insulinverbindungen sind die Vorstufe des Insulins, das Proinsulin, und die beiden biologisch inaktiven Peptide, die A- und die B-Kette, aus denen sich das Insulinmolekül zusammensetzt (RUBENSTEIN et al., 1972; LÜBKE et al., 1975).

Die Ketten zeigten, getrennt oder zusammen geprüft, keine Bindung am Rezeptor. Auch für das Proinsulin war die Bindung nur gering (CUATRECASAS et al., 1971; FREYCHET et al., 1971b). Eine weitgehende Übereinstimmung der biologischen Aktivität in vitro im Vergleich zu den Bindungseigenschaften wurde in Untersuchungen von GLIEMANN und GAMMELTOFT (1974) und FREYCHET et al. (1974) für eine große Zahl von Insulinderivaten erbracht.

Weiter wurde auf die Frage eingegangen, inwieweit eine Beziehung zwischen Insulinrezeptoren und Insulinresistenz besteht. Unter Insulinresistenz wird im allgemeinen ein Zustand verstanden, in dem die Wirkung des Insulins im Organismus herabgesetzt ist. Die Insulinresistenz muß deutlich unterschieden werden von solchen pathologischen Zuständen, bei denen hohe Mengen an Insulinantikörper im Plasma auftreten oder eine erhöhte Metabolisierungsrate des Insulins eine Insulinresistenz vortäuscht. Hierbei wird das Hormon inaktiviert, bevor es an seinem Wirkort ankommt. In solchen Fällen liegt eher ein Insulinantagonismus als eine Insulinresistenz im Sinne einer Unterempfindlichkeit des Gewebes gegenüber Insulin vor (CERASI und LUFT, 1972).

Als typisches Beispiel für die Insulinresistenz gilt die Fettsucht, sowohl beim Menschen als auch bei verschiedenen Versuchstieren (MELANI et al., 1967; SELTZER et al., 1967; STAUFFACHER et al., 1971; STERN et al., 1972; SIMS et al., 1973) Endokrinologische Störungen verursachen auch häufig eine modifizierte Insulinwirkung. Hierzu zählen die Schilddrüsenunterfunktion (Myxödem), erhöhte Wachs-

tumshormonspiegel (Akromegalie), Glukocorticoid-überschuß (Cushing-Syndrom) und Überproduktion von Adrenalin (Phäochromozytom) (BASTENIE, 1969; HASSELBLATT, 1969; PFEIFFER, 1969; ZIEGLER und PFEIFFER, 1969; SCRIBA und v.WERDER, 1972). Insulinresistenz tritt ferner in der Schwangerschaft auf, die durch hohe Spiegel an Östrogenen, Gestagenen, Prolactin und des plazentaren Hormons, "Human Placental Lactogen" (HPL) gekennzeichnet ist (BECK, 1969; KALKHOFF et al., 1970 PITKIN et al., 1970; COSTRINI und KALKHOFF, 1971). Auch synthetische Gestagene können eine Insulinresistenz hervorrufen. Eine unveränderte Glukosetoleranz bei erhöhten Seruminsulinspiegeln nach Glukosebelastung ist nach Medroxyprogesteronacetat beim Menschen gefunden worden (VERMEULEN und THIERY, 1974). Eine verschlechterte Glukosetoleranz mit erhöhten Insulinspiegeln wurde dagegen beim Menschen nach Ethynodiol-diacetat und Norgestrel beobachtet (SPELLACY et al., 1972; 1974).

Bereits die Untersuchungen von FREYCHET et al. (1972b) und KAHN et al. (1972; 1973) wiesen darauf hin, daß die Insulinresistenz mit Veränderungen in den Eigenschaften der Insulinrezeptoren verknüpft sein könnte. Die Autoren untersuchten Insulinrezeptoren an Leber- und Fettzellmembranen von Mäusen mit genetisch bedingter Fettsucht (homozygote Träger des Merkmals ob, ob/ob). Auch an Herzmuskelmembranen und Thymozyten dieser Tiere konnte eine verminderte Anzahl von Insulinrezeptoren festgestellt werden (SOLL et al., 1974; FORGUE und FREYCHET, 1975). Es sollte deshalb untersucht werden, ob eine Herabsetzung der Zahl an Bindungsstellen wie bei der fettsüchtigen

Maus (ob/ob) auch bei der durch Gestagene hervorgerufenen Insulinresistenz nachzuweisen ist. Durch weitere Experimente mit Insulin wurde versucht, auf Fragen des Wirkungsmechanismus einzugehen.

2 Experimenteller Teil

2.1 Materialien

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Substanzen verwendet:

2.1.1 Hormone

Insulin und Insulinderivate

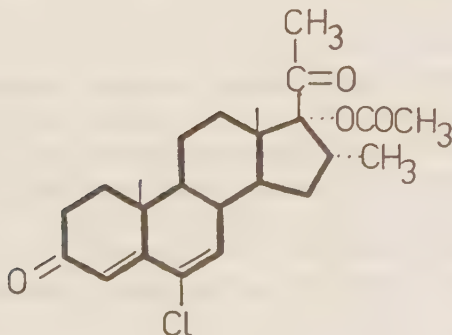
- Kristallines Insulin (Rind), 24 internationale Einheiten (Abk. I.E.)/mg; Dr. Christian Brunnengräber, Chemische Fabrik & Co.m.b.H., Lübeck
- Alt-Insulin^(R) (Rind), chromatographisch gereinigt, 40 I.E./ml, Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt am Main
- Depot-Insulin^(R) (Rind), chromatographisch gereinigt, 40 I.E./ml; enthält 0,167 mg/ml Bis-(4-amino-chinaldin-6-)-N,N'-harnstoff-hydrochlorid (Surfen), Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt am Main
- Radioaktiv markiertes ¹²⁵J-Insulin (Rind), 20 ng/ml, >50 µCi/µg in Phosphatpuffer, 0,5 % Albumin, 0,6 mM Thiomersalat, pH 7,4, Radiochemical Centre, Amersham, England
- A- und B-Ketten des Insulins (Rind)
- $\left[(\text{Carbamoyl-Gly})^{\text{A1}}, (\text{Carbamoyl-Phe})^{\text{B1}} \right]$ -Insulin (Rind), Derivat Nr. 1

- $\left[(\text{Glykolsäure})^{\text{A1}}, (\beta\text{-Phenylmilchsäure})^{\text{B1}} \right]$ -Insulin (Rind), Derivat Nr. 2
- $\left[(\text{Acetyl-Gly})^{\text{A1}}, (\text{Acetyl-Phe})^{\text{B1}} \right]$ -Insulin (Rind), Derivat Nr. 3
- $\left[\text{Ala}^{\text{A6}}, \text{HCys}^{\text{A7}} \text{ Des } (\text{Thr}^{\text{A8}}\text{-Ser}^{\text{A9}}), \text{Ala}^{\text{A11}} \right]$ -Insulin (Schwein), Derivat Nr. 4
- Katzeninsulin

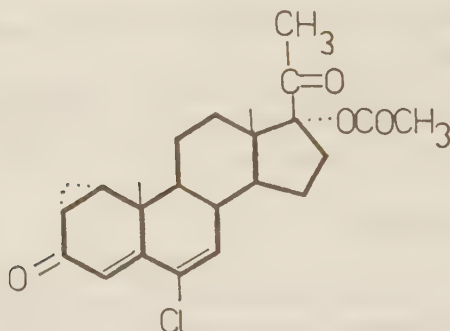
A- und B-Ketten, Insulinderivate und Katzeninsulin wurden freundlicherweise von Herrn Dr. K. Lübke zur Verfügung gestellt.

Gestagene

- Clomegestonacetat; 6-chlor-17 α -acetoxy 16 α -methyl-4,6-pregnadien-3,20-dion



- Cyproteronacetat; 6-chlor-1,2 α -methylen 17 α -acetoxy-4,6-pregnadien-3,20-dion



Diese Verbindungen wurden vom Department Steroidchemie der Schering AG, Berlin/Bergkamen erhalten.

2.1.2 Sonstige Substanzen

-Kollagenase, lyophilisiert, rein, 150 - 200 Mandl Einheiten/mg, Serva, Heidelberg oder Worthington, Freehold, N.J.

- Phthalsäuredinonylester, E. Merck, Darmstadt

- Ficoll^(R) (ein Copolymer aus Rohrzucker und Epichlorhydrin), Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala

- Radioaktiv markierte 1-¹⁴C-Glukose, spezifische Aktivität 3,9 μ Ci/mM, Radiochemical Centre, Amersham, England

- Heparin, Teer-Chemie, Hamburg

- Insta-Gel^(R), Packard, Illinois
- Nembutal^(R), Abbott, Ingelheim
- Serumalbumin (Rind), lyophilisiert, rein, Serva, Heidelberg
- Serumalbumin (Rind), trocken, reinst, Behring Werke, Marburg/Lahn
- Urovison^(R), (ein Gemisch des Natrium- und Meglumin-salzes (40:18) der Aminotrizoesäure (N'N-Diacetyl-3,5-diamino-2,4,6-trijodbenzoesäure oder Trizoesäure) in Wasser), Schering AG, Berlin/Bergkamen

Alle andere verwendete Chemikalien waren kommerziell zugängliche p.A.-Ware.

2.2 Tiermaterial und Behandlung

2.2.1 Ratten

Im allgemeinen wurden weibliche Wistar Ratten (Züchter: Dr. Hagemann, Bösingfeld/Lippe) mit einem Körpergewicht von 140 - 160 g verwendet. Die Tiere wurden in Sammelkäfigen auf Holzspähnen in Gruppen von fünf Tieren gehalten und mit Heri-lan^(R), Eggersmann, Rinteln gefüttert.

Behandlung mit Clomegestonacetat

Weibliche Ratten mit einem Anfangsgewicht von 140 - 160 g wurden täglich mit Clomegestonacetat subkutan (Abk. s.c.) gespritzt. Die Substanz wurde in Benzylbenzoat gelöst und mit Rizinusöl im Verhältnis 1:10 verdünnt. Das Applikationsvolumen betrug 1 ml/kg. In analoger Weise wurde ein Kontrollkollektiv mit dem Lösungsmittel gespritzt. Die Tiere wurden am Versuchstag nicht behandelt.

An zehn Ratten, die 13 Tage lang in einer Dosis von 2,5 mg/kg so behandelt worden waren, wurde ergänzend zum intravenösen Glukosetoleranztest (SCHILLINGER et al., 1974) ein Insulinbelastungstest durchgeführt.

An 20 Ratten, die in gleicher Weise behandelt worden waren, wurden Versuche zur Bestimmung der Insulinrezeptoren durchgeführt. Nach 6, 12, 18, 24 und 36 Tagen Behandlung wurden je 3 - 5 Tiere in den Versuch genommen. Die gefütterten Ratten wurden getötet. Aus dem Blut wurde der Gehalt an Glukose und aus dem Serum Insulin bestimmt. Das Fettgewebe wurde zur Bestimmung von Insulinrezeptoren und des Fettzelldurchmessers benutzt. In weiteren Versuchen wurde die Dosis auf 8 mg/kg erhöht. Nach 6, 9, 12, 15 und 18 Tagen der Behandlung wurden die gleichen Experimente wie oben durchgeführt. Das Körpergewicht der Tiere betrug nach der Behandlung etwa 220 g.

Behandlung mit Cyproteronacetat

Weibliche Ratten wurden täglich s.c. mit 2 mg/kg Cyproteronacetat behandelt. Cyproteronacetat wurde in Benzylbenzoat gelöst und mit Rizinusöl im Verhältnis 1:10 verdünnt. Die Substanz wurde in einem Volumen von 1 ml/kg verabreicht. Kontrolltiere wurden nur mit dem Lösungsmittel behandelt.

An zehn Ratten mit einem Anfangskörpergewicht von 140 - 160 g wurde nach elftägiger Behandlung eine intravenöse Glukosetoleranztest durchgeführt.

An zwölf Ratten mit einem Anfangsgewicht von 160 - 180 g, die in gleicher Weise behandelt worden waren, wurde nach 8, 11, 14 und 17 Tagen Behandlung Insulinbindungsstellen an Fettzellen bestimmt. Gleichzeitig wurden Glukose und Insulin aus dem Serum sowie der mittlere Durchmesser der Fettzellen bestimmt. Am Ende der Behandlung hatten die Tiere Körpergewichte bis 200 g erreicht.

Behandlung mit Insulin

15 männliche Ratten mit einem Anfangsgewicht von 160 - 170 g wurden fünfmal/Woche mit Alt-Insulin^(R) s.c. gespritzt. Insgesamt wurden die Ratten 13 Wochen lang behandelt. Die Dosis betrug in den ersten vier Behandlungswochen 1 I.E./kg, für die restlichen neun Wochen wurde sie auf 1 I.E./Tier erhöht. Am Ende der Behandlung wurde ein Versuch zur Messung der Insulinbindung durchgeführt mit vier behandelten und fünf Kontrolltieren und am folgenden Tag mit fünf behandelten und vier Kontrolltieren. Zu diesem Zeit-

punkt hatten die Tiere ein Körpergewicht von 310 - 330 g erreicht.

In einem zweiten Versuch wurde ein Kollektiv von fünf weiblichen Ratten mit einem Anfangsgewicht von 110 - 130 g fünf Tage lang in zwölfstündigem Abstand s.c. mit Depot-Insulin^(R) gespritzt. Die Dosis betrug 8 I.E./kg und wurde in einem Volumen von 1 ml/kg appliziert. Als Kontrolle wurde ein Kollektiv entsprechend mit 0,9 % NaCl behandelt. Am Ende der Behandlung hatten die Tiere ein Körpergewicht von 125 - 140 g erreicht.

2.2.2 Andere Spezies

Mäuse

Im allgemeinen fanden weibliche NMRI-Mäuse (Züchter: Schering AG, Berlin/Bergkamen) im Alter von 1 - 4 Monaten mit einem Körpergewicht von 20 - 30 g Verwendung. Sie wurden in Gruppen von 5 - 10 Tieren gehalten und mit Altromin M^(R), Altrogge, Lage/Lippe gefüttert.

Mäuse mit genetisch bedingter Fettsucht (ob/ob) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Dr. L. Herberg, Diabetes Forschungsinstitut, Universität Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Die Mäuse waren ca. vier Monate alt und hatten ein Körpergewicht von 45 - 55 g.

An den Fettzellen der Mäuse wurden Insulinrezeptoren bestimmt.

Hund, Katze und Affe

Für einige orientierende Versuche zur Messung der Insulinbindung wurde Fettgewebe vom Hund, der Katze und vom Affen erhalten. Die Tiere stammten aus Versuchen, die bei der Schering AG, Berlin/Bergkamen durchgeführt wurden.

2.3 Methoden

2.3.1 Insulinrezeptoren an Fettzellen

Isolierung von Fettzellen

Die Isolierung von Fettzellen wurde nach der Methode von ROBBELL (1964) durchgeführt. Dazu wurden Fettgewebsstücke mit Kollagenase inkubiert. Das Enzym zersetzt das Bindegewebe und ermöglicht dadurch die Freisetzung einzelner Zellen aus dem Gewebe. Wegen des hohen Lipidgehaltes flottieren die Fettzellen und lassen sich leicht von den übrigen Zellen des Gewebes und dem Medium isolieren.

Von weiblichen Ratten und Mäusen wurde parauterines, von männlichen Ratten epididymales, von Hunden, Katzen und Affen Fettgewebe aus dem Omentum majus verwendet. Die Tiere wurden getötet, die Bauchhöhle eröffnet und das Fettgewebe entnommen. Das Gewebe wurde in 0,9 % NaCl gespült und kleingeschnitten. Dabei wurde nur feines Fettgewebe verwendet. Eine Ausnahme in dieser Hinsicht bilden Versuche, bei denen Fettgewebe von unterschiedlich behandelten Tieren verglichen werden sollten. Bei diesen Untersuchungen

wurde das gesamte parauterine oder epididymale Fettgewebe benutzt.

Für die Präparation und Inkubation der Fettzellen wurden ausschließlich Plastikgefäße benutzt. Bis zu 3 g Gewebe wurde in einer 25 ml fassenden Plastikflasche in 3 ml Puffer bei 37°C eine Stunde im Schüttelthermostaten (70 Stöße/Minute) inkubiert. Als Inkubationsmedium diente Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer: 120 mM NaCl, 4,4 mM KCl, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 1,3 mM CaCl_2 , 1,2 mM KH_2PO_4 und 2,5 mM NaHCO_3 . Der frisch hergestellte Puffer wurde eine Stunde mit O_2/CO_2 (95:5) begast und kühl aufbewahrt. Der Puffer enthielt zusätzlich 5 mg/ml Kollagenase, 0,54 mg/ml Glukose und 20 mg/ml Albumin (Serva). Der pH-Wert betrug 7,4. Nach einer Modifizierung der Methode von RODBELL durch GAMMELTOFT und GLIEMANN (1973) wurden anstelle von 5 mg/ml nur 0,5 mg/ml Kollagenase verwendet, dafür jedoch 90 Minuten inkubiert. Am Ende der Inkubation wurde die Suspension durch Perlonstrumpfgewebe (20 den) in ein Plastikzentrifugenröhrchen überführt und eine Minute bei 200 x g zentrifugiert, wodurch sich die Fettzellen an der Oberfläche sammeln und die darunter befindliche Phase leicht durch ein Plastikröhrchen entnommen werden kann. Die Zellsuspension wurde 2 - 3 mal mit auf 37°C vorgewärmtem Puffer gewaschen und in einem gewünschten Volumen des Albuminpuffers suspendiert.

Messung der Insulinrezeptoren

Der Nachweis der Insulinrezeptoren beruht auf der Messung der spezifischen Bindung von radioaktiv markiertem Insulin an Fettzellen. Insulin adsorbiert erfahrungsgemäß auch an Gefäßwänden oder in unspezifischer Weise am Gewebe selbst. Um diese Art der Adsorption auszuschließen, wird ein 10 000-facher Überschuß von nicht markiertem Hormon einem Teil der Proben zugesetzt. Der Anteil an markiertem Insulin, der sich durch nicht markiertes Hormon ersetzen läßt, wird als die spezifische Bindung bezeichnet.

Zur Bestimmung der Insulinbindungsstellen wurden in 1,5 ml Eppendorffgefäße 100 oder 150 µl einer dichten Fettzellsuspension einpipettiert. Dazu wurden 50 µl ^{125}J -Insulin ($3,33 \times 10^{-9}\text{M}$, spezifische Aktivität $>50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) hinzugefügt. Um höhere Konzentrationen an Insulin dieser Lösung zu erreichen, wurde nicht markiertes Insulin in entsprechender Konzentration zugesetzt. Den Proben wurden weiterhin 50 µl eines Puffers nach ARCHER et al. (1973a) zugefügt, der 25 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 120 mM NaCl, 1,2 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 5 mM KCl, 1 mM EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure Na_2 -Salz), 10 mM Glukose, 1,5 mM Natriumacetat und 1 mg/ml Albumin (Serva) enthält. Zur Messung der unspezifischen Bindung wurden einem Teil der Proben statt Puffer $3,33 \times 10^{-5}\text{M}$ nicht markiertes Insulin im gleichen Puffer zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 23°C und dauerte 90 Minuten. Da Fettzellen zur Flotation neigen, ist eine gründliche Durchmischung der Zellen mit dem wäs-

serigen Medium im normalen Schüttelbad nicht immer gewährleistet. Deshalb wurde ein speziell zu diesem Zweck konstruierter Reagenzglasständer in einem Schüttelbad mit beweglichem Raster benutzt. Abb. 1 zeigt den Reagenzglasständer mit Eppendorffgefäßen und dem unten befindlichen beweglichen Raster von oben und in Seitenansicht. Während des Schüttelns wird dabei jedes Gefäß unten leicht angestoßen. Bei Zellmengen im Bereich von 50 - 150 μ l dichter Fettzellsuspension (entsprechend etwa 500 mg Zelltrockengewicht/ml) ist die Durchmischung ausreichend, was sich anhand der Steigerung der Insulinbindung zeigen läßt. Die Trennung der Fettzellen vom Medium erfolgte in Anlehnung an eine Methode von GLIEMANN et al. (1972). Dabei wurden die Proben mit 200 μ l Phthalsäuredinonylester überschichtet und anschließend in einer Beckman Microfuge^(R) zentrifugiert (10 000 x g, Zimmertemperatur, 30 Sekunden). Phthalsäuredinonylester ist nicht wasserlöslich und hat eine Dichte, die zwischen der der Fettzellen und der des wässerigen Mediums liegt. Nach der Zentrifugation sammeln sich die Fettzellen über dem Phthalsäuredinonylester und können leicht mit einer Eppendorff-Pipette mit abgeschnittener Spitze abgehebert werden. Jeder Wert wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Im allgemeinen wurde das Trockengewicht (Tr. Gew.) der Fettzellen als Bezugsgröße der Bestimmung zugrunde gelegt. Zur Trockengewichtsbestimmung wurde ein aliquoter Teil der bei der Messung der Insulinrezeptoren verwendeten Zellsuspension entnommen, bei 70°C über Nacht in einem vortarierten Gefäß getrocknet und anschließend gewogen. Ebenso wurde mit

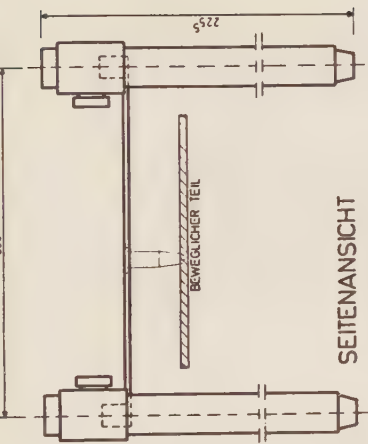
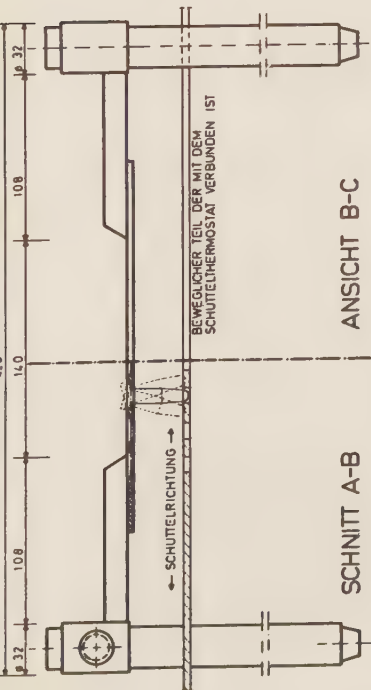
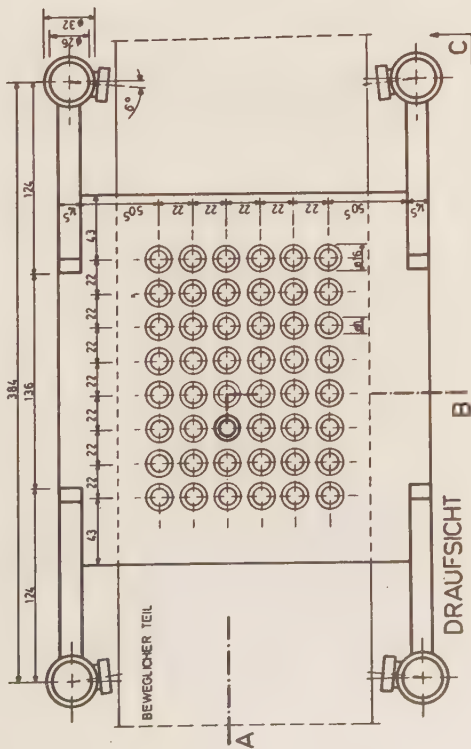


ABBILDUNG 1:

REAGENZGLASSTÄNDER ZUR
SCHÜTTELUNG VON FETT-
ZELLEN IN EPPENDORFF-
GEFÄßEN

ALLE MASSE IN MM
SEPTEMBER 1976
MARIA KRAUTH



einem gleichen Volumen des reinen Puffers verfahren. Das Trockengewicht der in der Suspension enthaltenen Zellen ergibt sich aus der Differenz beider Gewichte.

Die Ergebnisse der Insulinbindungsanalysen wurden in pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew. angegeben. Die zugegebene Menge von 50 µl der markierten Insulinlösung enthält 1 ng Insulin. Nachdem von jedem Meßwert der "background" abgezogen worden ist, kann die folgende Formel zur Berechnung angewendet werden:

$$\frac{\text{gemessene Impulse} \times 1000 \times 100}{\text{Gesamtimpulse} \times \text{Tr. Gew. (mg)}} =$$

$$= \text{pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew.}$$

Die spezifische Bindung wird durch Abzug der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung berechnet.

In einigen Versuchen war es notwendig, die Insulinbindung auf die Zahl der Fettzellen zu beziehen. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die zur Messung der Insulinbindung verwendete Fettzellsuspension 1:100 mit Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer verdünnt. Aus diesem Gemisch wurde unter Umrühren 5 µl entnommen und die darin enthaltenen Fettzellen sofort unter dem Mikroskop gezählt. Die Zahl der Fettzellen wurde mit zwei Parallelverdünnungen und je sechs Auszählungen durchgeführt. Der mittlere Durchmesser der Fettzellen wurde unter Verwendung eines Mikrometerokulars aus >50 Zellen bestimmt.

2.3.2 Insulinrezeptoren an Lymphozyten

Isolierung von Lymphozyten

Zur Isolierung von Lymphozyten wurde Blut von klinisch gesunden Frauen und Männern, sowie von Hunden und Kaninchen verwendet. Vom Menschen wurde das Blut aus der Vena cubitalis, vom Hund aus der Vena jugularis und vom Kaninchen durch Entbluten gewonnen. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte nach zwei Verfahren:

In Anlehnung an eine von BÖYUM (1967) beschriebene Methode wurden Lymphozyten durch diskontinuierliche Gradientenzentrifugation über einem Ficoll^(R)-Urovison^(R)-Gemisch von den übrigen Blutzellen getrennt. Ficoll^(R) bewirkt eine Verklumpung der Erythrozyten, die sich dadurch am Boden des Zentrifugenglases absetzen. Wegen ihrer relativ geringen Dichte bleiben die Lymphozyten im Gegensatz zu den übrigen Leukozyten nach der Zentrifugation in der Trennphase.

50 ml Blut wurden mit 2 ml 10 %igem EDTA pro 100 ml Blut versetzt, um die Gerinnung zu verhindern, und mit 150 ml 0,9 %igem NaCl im Verhältnis 1:4 verdünnt. Zur Trennung wurden 100 ml des verdünnten Blutes vorsichtig auf 35 ml eines Ficoll^(R)-Urovison^(R)-Gemisches in ca. 200 ml fassenden Zentrifugengläser mit einem Durchmesser von 5 cm geschichtet. 100 ml des Ficoll^(R)-Urovison^(R)-Gemisches enthalten 17,4 ml 58 %iges Urovison^(R), 70,6 ml 9 %iges (Gewicht/Volumen) Ficoll^(R) und 12,0 ml bidestilliertes Wasser. Diese Lösung soll eine Dichte von ca. 1,08 g/ml haben. Die anschließende diskontinuierliche Gradient-

enzentrifugation wurde 40 Minuten bei 250 x g und Zimmertemperatur durchgeführt. Danach bilden die Lymphozyten eine dünne weiße Schicht in der Trennphase und können mit einer Pasteur-Pipette abgehebert werden. Die aus mehreren Zentrifugationsgängen erhaltenen Lymphozyten wurden vereinigt und anschließend gewaschen.

Die zweite Methode der Gewinnung von Lymphozyten beruht auf dem unterschiedlichen Sedimentationsverhalten von Erythrozyten und Lymphozyten. 100 ml Blut, das mit 2 ml 10 %igem EDTA versetzt war, wurde in einem Meßzylinder ca. zwei Stunden bei Zimmertemperatur gehalten. Danach wurde die Leukozyten-reiche Plasmaschicht, die ca. 1/5 des Gesamtvolumens ausmacht, mit einer Pasteur-Pipette abgehebert und die darin enthaltenen Zellen gewaschen.

50 ml der nach einer der beiden Methoden gewonnenen Lymphozytensuspension wurden mit 0,9 %igem NaCl auf ein Volumen von ca. 100 ml gebracht, auf zwei ca. 70 ml fassende Zentrifugengläser verteilt und zentrifugiert (250 x g, 20 Minuten, Zimmertemperatur). Der Überstand wurde verworfen, der Niederschlag mit 50 ml 0,9 %igem NaCl suspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 1 - 2 ml Puffer nach ARCHER et al. aufgenommen.

Aus der Zellsuspension wurde die Zellzahl pro ml ermittelt, gegebenenfalls wurden Ausstrichpräparate zur Differentialzählung gemacht. Anschließend wurde die Suspension auf die für den Insulinbindungstest entsprechend vorbereiteten Gefäße verteilt. Im allgemeinen wurden die Proben bis zur Messung der In-

sulinbindungsstellen bei -18°C aufbewahrt.

Messung der Insulinrezeptoren

Für den Insulinbindungstest mit Lymphozyten wurden 4 ml fassende Plastikröhrchen verwendet. Um eine Adsorption des Insulins an den Gefäßinnenwänden weitgehend zu verhindern, waren die Röhrchen mit Puffer vorbehandelt, der 4 % Albumin anstelle von 0,1 % enthielt. Inkubation, Trennung und Messung der Radioaktivität wurde in denselben Röhrchen durchgeführt. Im allgemeinen hatte eine Probe ein Gesamtvolumen von 350 μl . Zu 200 μl der Lymphozytensuspension (etwa 5×10^7 Zellen/ml) wurden 100 μl ^{125}J -Insulin ($3,33 \times 10^{-9}\text{M}$, spezifische Aktivität $>50 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$) und 50 μl Puffer pipettiert. Zur Ermittlung der unspezifischen Bindung wurden anstelle des Puffers 50 μl einer Lösung von $3,33 \times 10^{-5}\text{M}$ an nicht markiertem Insulin zugesetzt. Die Inkubation erfolgte 90 Minuten bei 15°C im normalen Schüttelbad.

Nach der Inkubation wurden die Proben ins Eisbad gestellt und mit 1,5 ml eisgekühltem Puffer, der jetzt 1 % Albumin enthielt, versetzt. Sofort danach erfolgte die Trennung von gebundenem und freiem Insulin durch Zentrifugation bei $2000 \times g$ und 4°C für 10 Minuten in einer Christ - Kühlzentrifuge, Modell KS IV Junior. Der Überstand wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt. Anschließend wurde die Radioaktivität im Niederschlag gemessen. Der Test wurde in Dreifachwerten durchgeführt. Die Mittelwerte der Bindung des Insulins wurden unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität in ng/ml Ansatz angegeben.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde die Lymphozytensuspension je nach Dichte im Verhältnis 1:100 oder 1:1000 mit 3 %iger Essigsäure verdünnt. Durch die Essigsäure platzen die noch in der Lösung befindlichen Erythrozyten. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Schilling-Zählkammer. Die Zellzahl wurde angegeben als Mittelwert aus Zählungen von vier großen Quadraten der Zählkammer.

Zur Bestimmung des Anteils an Lymphozyten in der Leukozytensuspension wurden Differentialzählungen an Ausstrichpräparaten durchgeführt. Die Zellen wurden mit 3 %iger Giemsa's Lösung nach einer vom Hersteller ausgearbeiteten Vorschrift (E. Merck, Klinisches Labor, 11. Auflage) gefärbt; >100 Zellen wurden jeweils ausgezählt.

2.3.3 Intravenöser Glukosetoleranztest

Die intravenöse Injektion von Glukose bewirkt einen sofortigen Anstieg von Insulin im Blut. Innerhalb eines bestimmten Zeitraumes fallen der Blutzucker und das Insulin wieder auf das Ausgangsniveau ab. Aus der Geschwindigkeit des Glukoseabfalls kann auf die Wirksamkeit des Insulins geschlossen werden, den Glukoseabstrom aus dem Blut zu stimulieren.

Die Versuchstiere waren 18 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten worden. Sie wurden zunächst durch intraperitoneale Injektion von 40 mg/kg Nembutal^(R) narkotisiert. Danach wurden 5 ml/kg einer 20 %igen Glukoselösung (entsprechend 1 g/kg) in eine Schwanzvene injiziert. Nach 0 (Vorwert), 10 und 20 Min. wurde Blut für die Bestimmung des Blutzuk-

kers und des Seruminsulins mit einer Pasteur-Pipette aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen (Methode nach HALPERN und PACAUD, 1951). Um die Blutgerinnung zu verhindern, waren die Pipettenspitzen vorher mit einer Heparinlösung (1g/l) vorbehandelt worden.

2.3.4 Intravenöser Insulinbelastungstest

Der intravenöse Insulinbelastungstest wurde wie der Glukosetoleranztest durchgeführt. Statt Glukose wurden jedoch 300 mE/kg Insulin in 5 ml intravenös injiziert.

Die Messung der Blutzucker-senkenden Wirkung verschiedener Insulinderivate erfolgte ebenfalls nach dieser Methode.

2.3.5 Glukosebestimmung

Das Prinzip der Methode beruht auf der Oxydation der Glukose durch eine spezifische Glukoseoxydase (GOD) zu Glukonolakton, das in wässriger Lösung in Glukonsäure übergeht. Das hierbei entstehende Wasserstoffperoxyd oxydiert in Gegenwart von Peroxydase (POD) 2,2'-Azino-di-3-äthyl-benzthiazolinsulfonsäure-(6)diammoniumsalz (ABTS) zu einer blau-grün gefärbten Verbindung. Die Intensität des Farbstoffs ist proportional der Glukosekonzentration und wird bei einer Wellenlänge von 578 nm gemessen.

Sofort nach der Dekapitation wurden 50 µl Blut von Ratten oder Mäusen zur Enteiweißung in 0,5 ml einer Lösung von 0,16 %igem Uranylacetat und 0,9 %igem

NaCl pipettiert.

Die Bestimmung der Blutglukose im abzentrifugierten Überstand erfolgte nach der GOD-Perid^(R)-Methode, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim und wurde in Zweifachbestimmungen durchgeführt.

2.3.6 Bestimmung der Insulinkonzentration

Die radioimmunologische Messung der Insulinkonzentration im Serum wurde nach einem von CATT und TREGGAR (1967) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Der Insulin-Antikörper ist kovalent an das Teströhrchen gebunden und gestattet damit die saubere und rasche Trennung des Antigen-Antikörper-Komplexes vom freien Insulin.

Nach der Dekapitation der Versuchstiere wurde das Blut bis zum Abzentrifugieren des Blutkuchens zur Serumgewinnung ins Eisbad gestellt. Das Serum wurde bei -18°C aufbewahrt.

Die zur Messung benötigten Materialien wurden von Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim bezogen. Die Bestimmung wurde nach der vom Hersteller ausgearbeiteten Methode durchgeführt. Die Ergebnisse beziehen sich auf Zweifachbestimmungen pro Tier bei den Ratten. Von Mäusen wurde Serum nur für einen Einzelwert/Tier erhalten.

2.3.7 Bestimmung der Bindungsfähigkeit an Antikörper

Das Prinzip dieser von MORGAN et al. (1962; 1963; 1964) entwickelten Tests beruht auf einer Bindung von Insulin bzw. von Insulinderivaten an einem spezifischen Antikörper vom Meerschweinchen mit nachfolgender Trennung des gebundenen und freien Hormons durch eine zweite Immunreaktion, bei der der Antigen-Antikörper-Komplex durch einen gegen das Meerschweinchen- γ -Globulin gerichteten Antikörper präzipitiert wird.

Bei diesen Verfahren wird die Bindung von ^{125}J -Insulin an Antikörper durch die Anwesenheit eines Insulinderivats reduziert. Diese Reduktion der Bindung wird als Konkurrenz bezeichnet. Sie ist abhängig von der Konzentration der Testsubstanz und von ihrer Affinität.

Die Durchführung der Bestimmung erfolgte bei 4°C . 100 μl der zu untersuchenden Lösung wurden im Verhältnis 1:5 mit einem Boratpuffer verdünnt. Der Puffer enthält 0,14 M Borsäure, 0,01 % Thiomerosal (Merthiolat) und 5 % Albumin (Behring Werke). Der pH beträgt 7,4. Hinzugefügt wurden 50 μl ^{125}J -Insulin (Radiochemical Centre, Amersham), das mit 0,1 % Albumin enthaltenem Boratpuffer im Verhältnis 1:10 verdünnt worden war sowie 50 μl Anti-Insulin-Serum. Die Proben wurden 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde präzipitierendes Anti-Meerschweinchen-Serum vom Kaninchen sowie Meerschweinchen-Serum, das mit Boratpuffer ohne Zusatz von Albumin im Verhältnis 1:200 verdünnt worden war, zugegeben. Die Proben wurden erneut 16 - 24 Stunden inkubiert. Während dieser

zweiten Inkubation bildet sich ein Niederschlag. Dieser wurde 15 - 20 Minuten bei 2000 x g abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und aufgehoben. Der Niederschlag wurde mit 0,5 ml Boratpuffer, der 1 % Albumin enthielt, gewaschen. Im Anschluß daran wurde die Radioaktivität im Niederschlag und im Gesamtüberstand gemessen. Die Messung wurde in Dreifachwerten durchgeführt. Von der Gesamtaktivität wurde die unspezifische Insulinbindung subtrahiert und die Bindung auf dem Insulinstandard bezogen nach der Formel

$$\frac{\text{Gesamtbindung} - \text{unspezifische Bindung}}{\text{Standard}} \times 100 =$$

= % Bindung

berechnet.

2.3.8 Messung der insulinstimulierten Glukose-Oxydation am Fettgewebe der Ratte

Das Prinzip der von MARTINI und HAHN (1967) beschriebenen Methode besteht darin, daß das Fettgewebe der Ratte die Umwandlung von ^{14}C -Glukose zu $^{14}\text{CO}_2$ katalysiert. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion wird durch Insulin dosisabhängig beschleunigt. Diese Wirkung hat sich auch für die Charakterisierung von solchen Substanzen bewährt, die partielle Insulineigenschaften besitzen.

Weibliche Ratten mit einem Körpergewicht von 140 - 160 g wurden dekapitiert. Das parauterine Fettgewebe wurde entnommen. Für jede Probe kam etwa 100mg

kleingeschnittenes Fettgewebe, das vor der Inkubation einzeln abgewogen worden war, zum Einsatz. Die Inkubation erfolgte in Plastikgefäßen. Das Gesamtvolumen betrug 2 ml. Das Medium enthielt Krebs-Ringer-Bikarbonat-Puffer, pH 7,4 mit 2 % Albumin (Behring Werke), das nach CHEN (1967) gereinigt worden war. Außerdem wurde $1\text{-}^{14}\text{C}$ -Glukose in einer Endkonzentration von 10^{-3}M (spezifische Aktivität 10 000 - 40 000 Impulse pro Minute/ μmol) zugesetzt. Die zu untersuchende Substanz bzw. das als Vergleich dienende Rinderinsulin wurde im Albuminpuffer gelöst. Die Reaktion wurde mit der Zugabe der radioaktiven Glukose gestartet. Unmittelbar danach wurde mit O_2/CO (95:5) begast und das Plastikgefäß mit einer dichtschießenden Serumkappe verschlossen. An der Kappe ist eine Halterung für ein Gefäß befestigt, in dem sich ein Filtrierpapierstreifen befindet. Nach zweistündiger Inkubation im Schüttelthermostaten bei 37°C (70 Stöße/Minute) wurde auf das Filtrierpapier mit einer Tuberkulinspritze 0,3 ml einer 1 M methanolischen Hyaminelösung eingespritzt. Anschließend wurde das Medium mit 0,3 ml 5 N H_2SO_5 angesäuert. Das freigesetzte CO_2 wird dabei von Hyamine absorbiert. Zur Vervollständigung der Absorption wurden die Proben eine weitere Stunde geschüttelt. Danach wurde die Radioaktivität auf dem Filtrierpapierstreifen gemessen.

Die Wirksamkeit der zu untersuchenden Substanz wurde mit der des Rinderinsulins verglichen. Bei jedem Versuch wurde eine Insulin-Standard-Kurve aufgestellt in einem Konzentrationsbereich von 0 - $10^4 \mu\text{E/ml}$. Beim halblogarithmischen Auftragen von freigesetzter CO_2 -Menge gegen die Insulinkonzen-

tration ergibt sich ein linearer Bereich. Die Messungen wurden in Fünffachbestimmungen durchgeführt und als Prozent des Rinderinsulinstandards angegeben.

2.3.9 Messung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität des ^{125}J -Insulins wurde in einem Meßgerät für γ -Strahlen, Packard, Illinois, Modell 256 durchgeführt. Die Messung der Radioaktivität des $^{14}\text{CO}_2$ erfolgte im Scintillationsmeßgerät Tricarb^(R), Packard, Illinois.

2.4 Statistische Auswertung

Die Zahlenangaben der vorliegenden Arbeit stellen arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) und Standardabweichungen der Mittelwerte ($s_{\bar{x}}$) dar. Diese wurden berechnet nach den Formeln:

$$\bar{x} = \frac{\sum(x)}{n} \quad \text{bzw.} \\ s_{\bar{x}} = \pm \sqrt{\frac{\frac{\sum(x^2) - \sum(x)\bar{x}}{n-1}}{n}}$$

Die Standardabweichung der Differenz ($s_{\bar{x}_{\text{Diff}}}$), die bei der Berechnung der entsprechenden Werte für die spezifische Bindung benötigt wurde, erfolgte nach der Formel:

$$s_{\bar{x}_{\text{Diff}}} = \sqrt{\frac{s_{x_1}^2 + s_{x_2}^2}{n}}$$

Bei den Glukose- und Insulinbelastungsversuchen wurden die gemessenen Werte statistisch nach dem U-Test geprüft (SACHS, 1972). Zur Berechnung der Prüfgröße U wurden die (m + n) Stichprobenwerte in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge gebracht, wobei zu jeder Rangzahl vermerkt wurde, aus welcher der beiden Stichproben der zugehörige Wert stammte. Die Summe der auf Stichprobe 1 entfallenden Rangzahlen wurde mit R_1 bezeichnet, die Summe der auf Stichprobe 2 entfallenden Rangzahlen entsprechend mit R_2 . Anschließend wurden

$$U_1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_1 \quad \text{und} \quad U_2 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_2$$

berechnet. Die gesuchte Prüfgröße ist die kleinere der beiden Größen U_1 und U_2 . Unter Zugrundelegen der hierfür aufgestellten Tabelle kann der kritische Wert für U abgelesen werden.

Die statistische Prüfung der Werte aus der Messung der Insulinbindungsstellen erfolgte nach dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen (SACHS, 1972). Dabei wurde die Differenz d_i beider an einem Tag gemessenen Werte in eine ansteigende Rangordnung gebracht und mit Rangzahlen versehen. Bei jeder Rangzahl wurde vermerkt, ob die zugehörige Differenz ein positives oder ein negatives Vorzeichen aufweist. Die Summe der positiven und negativen Rangzahlen ($\hat{R}_p$ und $\hat{R}_n$) wurde

gebildet und die kleinere der beiden Rangsummen ($\hat{R}$) als Testgröße benutzt. Aus der entsprechenden Tabelle kann der kritische Wert für R ermittelt werden.

3 Ergebnisse

3.1 Ausarbeitung der Versuchsbedingungen

3.1.1 Insulinrezeptoren an Fettzellen

Die Isolierung von Fettzellen nach der Methode von RODBELL (1964) wurde nach den Angaben von GAMMELTOFT und GLIEMANN (1973) modifiziert. Dabei wurde die Konzentration an Kollagenase herabgesetzt und die Einwirkungszeit des Enzyms verlängert. Ein Unterschied in der Ausbeute an Fettzellen oder der an ihnen gemessenen Insulinbindung konnte beim Vergleich der beiden Verfahren nicht festgestellt werden. Die nach GAMMELTOFT und GLIEMANN isolierten Fettzellen schienen aber während der Inkubation zur Messung der Insulinbindung stabiler zu sein.

Die Trennung von gebundenem und ungebundenem Insulin erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von GLIEMANN et al. (1972) durch Zentrifugation der Zellen durch Phthalsäuredinonylester. Nach der Zentrifugation war keine Radioaktivität in der Trennschicht nachweisbar, d.h. Insulin aus dem Medium tritt nicht in die Trennphase über. Dadurch wurde sichergestellt, daß ausschließlich an Zellen gebundene Radioaktivität gemessen wurde.

Abhängigkeit der Insulinbindung von Zellmenge, pH, Temperatur und Zeit

Die Bindung von radioaktiv markiertem Insulin nahm mit steigender Menge der Fettzellsuspension zu und war bis 150 µl (entsprechend etwa 500 mg Tr. Gew./ml)

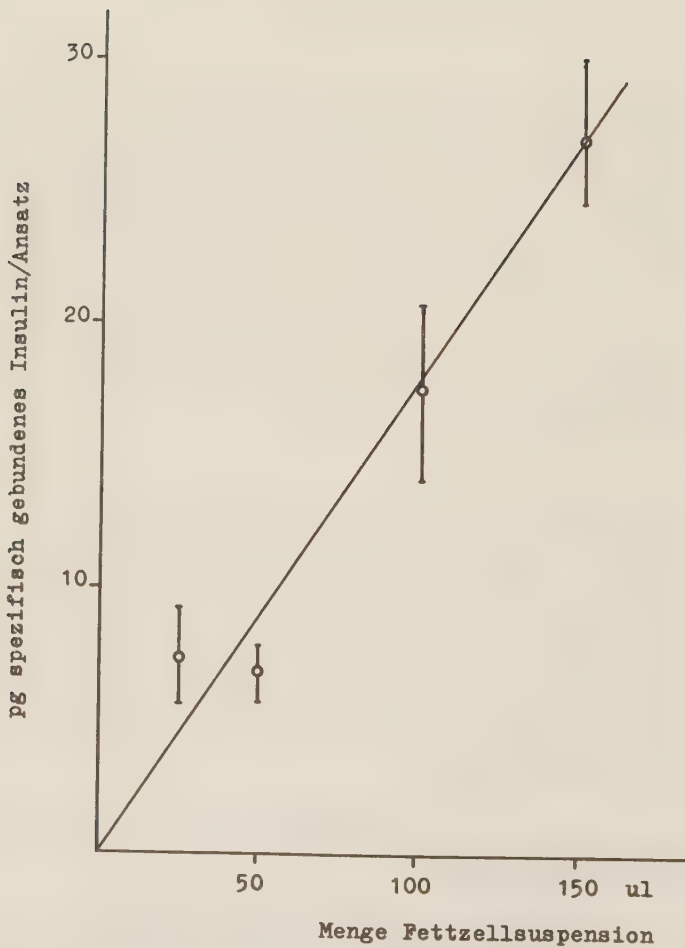


Abbildung 2:

Bindung von Insulin in Abhängigkeit von der Fettzellmenge; $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n = 5$

linear (Abb. 2). Das Volumen des Puffers wurde konstant gehalten (100 μ l), so daß durch die zugefügten größeren Mengen an Zellsuspension zwar das Gesamtvolumen stieg. Diese Maßnahme ging von der Überlegung aus, daß die Fettzellen nicht zur Erhöhung des Flüssigkeitsmediums beitrugen und daß damit die Konzentration des ^{125}J -Insulins im Ansatz konstant blieb. Etwa 2,5 % des insgesamt zugesetzten ^{125}J -Insulins wurde von den Fettzellen gebunden, wovon etwa 70 % auf die spezifische Bindung entfielen.

Wegen der kurzen Halbwertszeit des ^{125}J -Isotops (ca. 30 Tage) ließen sich die folgenden Experimente nicht mit derselben Charge an radioaktiv markiertem Insulin durchführen. Die auch unter den Kontrollen von Versuch zu Versuch aufgetretenen Unterschiede in der spezifischen Bindung können z.T. auf die nicht einheitliche Qualität der einzelnen Insulinpräparationen zurückzuführen sein.

Um den Einfluß des pH auf die Insulinbindung zu prüfen, wurden Fettzellen in einem pH-Bereich von 6,6 bis 8,3 inkubiert. Aus dem in Abb. 3 dargestellten Experiment geht hervor, daß eine Änderung des pH nur einen geringen Einfluß auf die Insulinbindung hatte. Die spezifische Bindung zeigte ein Optimum etwa bei pH 7,0.

Die Insulinbindung wurde in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei zwei verschiedenen Temperaturen untersucht. Bei Zimmertemperatur (23°C) stieg die spezifische Bindung mit zunehmender Inkubationszeit an und war nach 90 Minuten im Gleichgewicht. Bei 37°C wurde bereits nach 30 Minuten ein deut-

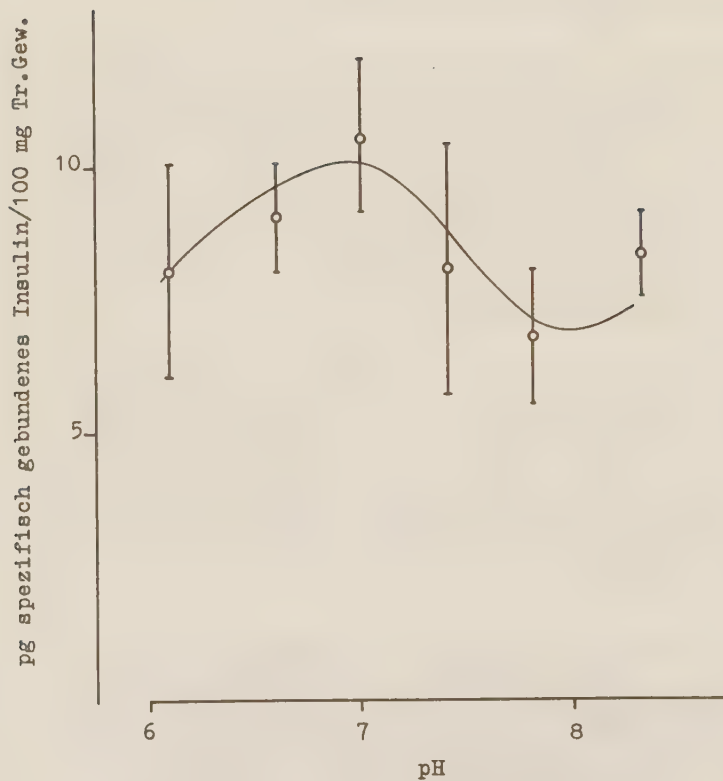


Abbildung 3:

Insulinbindung an Fettzellen in Abhängigkeit vom pH;
 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n = 3$

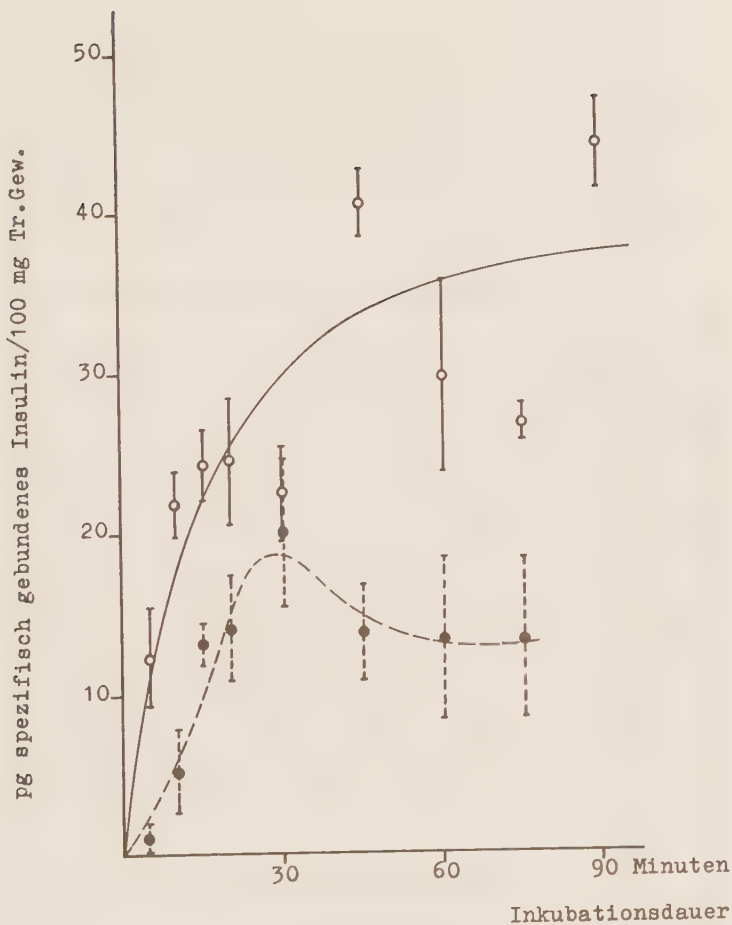


Abbildung 4:

Spezifische Insulinbindung an Fettzellen
in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer
bei 23°C (—○—) und 37°C (---●---);
 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n = 3$

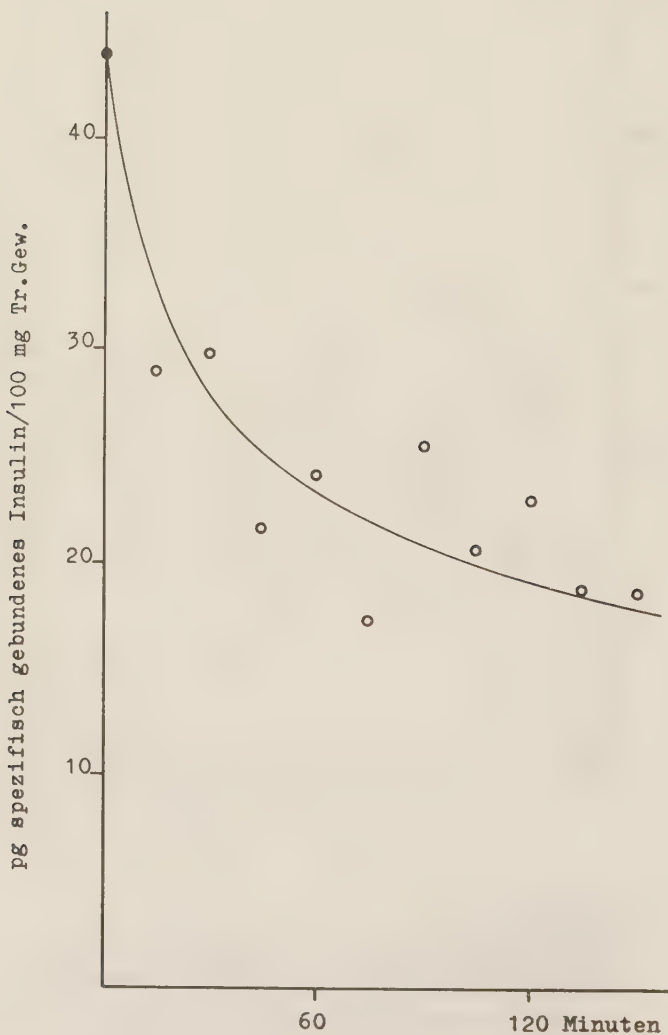


Abbildung 5:

Reversibilität der Bindung. Nach 90 Minuten Vorinkubation mit markiertem Insulin Verdrängung mit nicht markiertem Insulin in Abhängigkeit von der Zeit: $\bar{y} = a \cdot e^{-bx}$

liches Optimum der spezifischen Bindung erreicht. Aus dem Vergleich beider Versuche wurde geschlossen, daß die optimalen Bedingungen zur Messung der spezifischen Bindung bei 23°C und 90 Minuten Inkubationsdauer liegen (Abb. 4). Darum wurden diese Bedingungen auch im weiteren Verlauf der Untersuchungen beibehalten.

Prüfung auf Reversibilität der Bindung

Zur Prüfung der Reversibilität der Insulinbindung wurden Fettzellen 90 Minuten mit $0,83 \times 10^{-9} \text{M}$ radioaktiv markiertem Insulin vorinkubiert. Anschließend wurde unmarkiertes Insulin zugesetzt. Die Endkonzentration betrug dann $0,83 \times 10^{-5} \text{M}$. Die Abnahme an Radioaktivität, die an den Zellen gebunden ist, wurde über einen Zeitraum von 150 Minuten verfolgt. Bis zu 60 % des markierten Insulins wurde aus der Bindung verdrängt. Da der Kurvenverlauf immer noch abfallend war (Abb. 5) ist zu erwarten, daß sich das neue Gleichgewicht zu diesem Zeitpunkt noch nicht eingestellt hatte. Man kann daraus schließen, daß die Insulinbindung einen überwiegend reversiblen Prozeß darstellt.

Aufstellung einer Kompetitionskurve

Ein typischer Kurvenverlauf für die Konkurrenz von ^{125}J -Insulin und nicht markiertem Insulin am Insulinrezeptor ist in Abb. 6 dargestellt. Bereits bei einer Konzentration von $0,83 \times 10^{-9} \text{M}$ an nicht markiertem Insulin konnte Konkurrenz erzielt werden. Bei der höchsten Konzentration an nicht markiertem Insulin ($0,83 \times 10^{-5} \text{M}$) wurde ein Grenzwert an Bin-

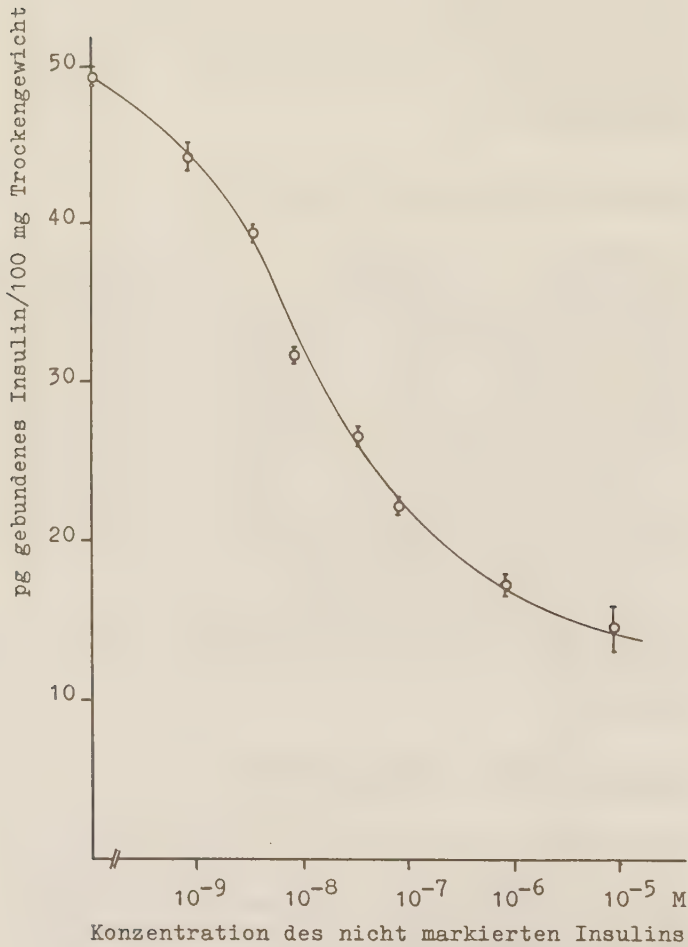


Abbildung 6:

Insulinbindung an Fettzellen, Kompetitionskurve;
 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}; n = 3$

dung erreicht, der sich durch weitere Steigerung der Insulinmenge praktisch nicht mehr erniedrigen läßt.

Abhängigkeit der Insulinbindung von der Konzentration

In Abb. 7 ist ein Versuch wiedergegeben, bei dem steigende Mengen radioaktives Insulin dem Inkubationsmedium zugesetzt wurden. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Bindung mindestens bis zu einer Konzentration von $5,5 \times 10^{-9} \text{M}$ linear zunimmt. Eine Erhöhung der Konzentration an radioaktivem Insulin war aus technischen Gründen nicht möglich. Allerdings ließ sich durch Zusatz von nicht markiertem Insulin unter Berücksichtigung der sich ändernden spezifischen Aktivität aus Kompetitionskurven die Sättigungskonzentration ermitteln. Die Berechnung der Sättigungskurve (Abb. 8) erfolgte unter der Annahme, daß die unspezifische Bindung mit der Konzentration linear zunimmt. Aus der Abbildung geht hervor, daß die Bindung bei etwa 200 mg Fettzellen (Tr. Gew./ml) bei einer Insulinkonzentration von ca. $4 \times 10^{-7} \text{M}$ abgesättigt war.

Ermittlung der Bindungskonstanten sowie der Bindungskapazität

Eine vielseitige und graphisch gut auswertbare Methode zur Ermittlung von Dissoziations- und Assoziationskonstanten ist die Berechnung nach SCATCHARD (1949), die auch für Bindungsreaktionen anzuwenden ist, unter der Annahme, daß die Bedingungen für das Massenwirkungsgesetz erfüllt sind. Zur Berechnung der Bindungskonstanten wird der Quotient aus gebundenem zu freiem (B/F) Insulin gegen die Konzentra-

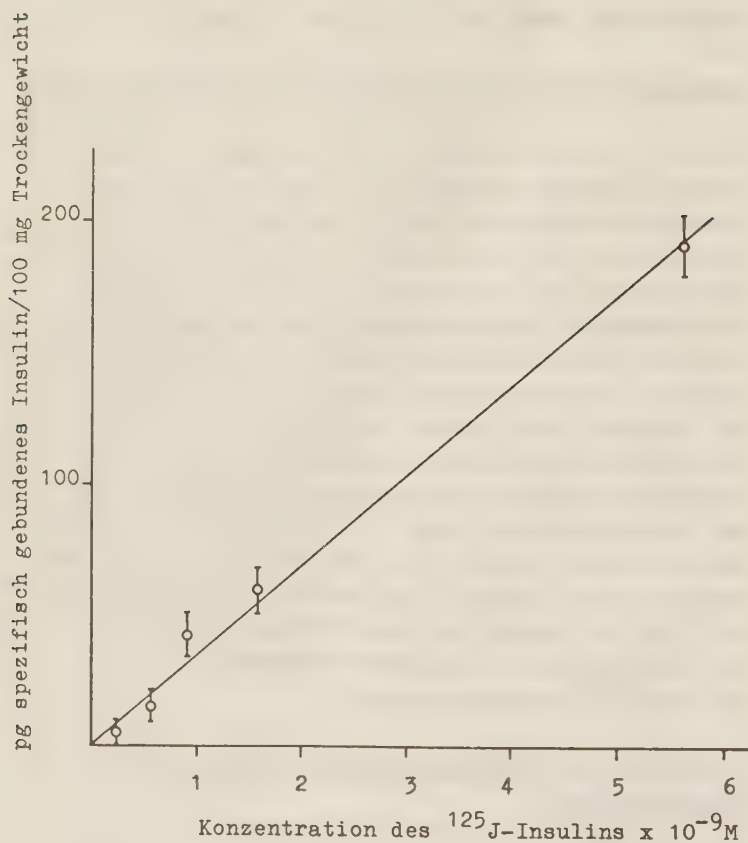


Abbildung 7:

Spezifische Insulinbindung an Fettzellen in
 Abhängigkeit von der Konzentration des ^{125}J -Insulins;
 $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n = 3$

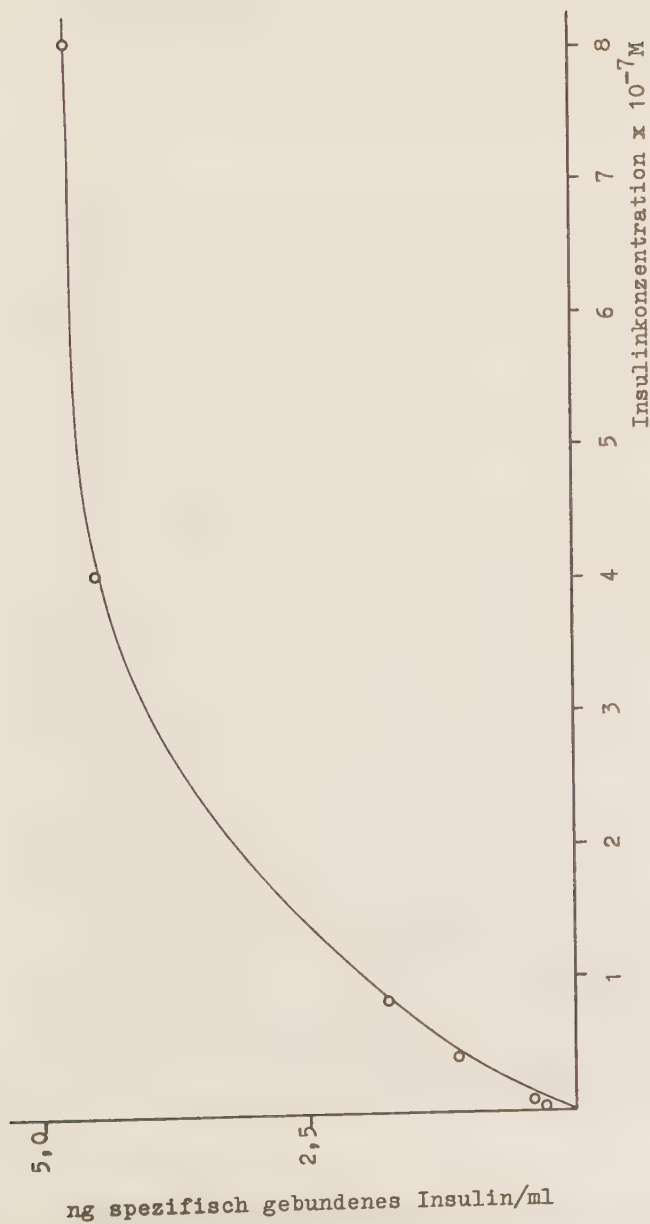


Abbildung 8: Die Sättigung der Insulinbindung an Fettzellen; $\bar{x}$, $n = 3$

tion an gebundenem (b) Insulin aufgetragen. Liegen die Meßwerte auf einer Geraden, so entspricht der Kotangens der Dissoziationskonstanten K_d und der Tangens der Assoziationskonstanten K_a . Der Schnittpunkt mit der Abszisse gibt die Bindungskapazität an.

In Abb. 9 sind die Meßwerte aus einem typischen Versuch zur Berechnung dieser Bindungsparameter aufgetragen. Es ergab sich keine Linearität, was auf eine heterogene Population an Bindungsstellen schließen ließ. Der durch die Meßpunkte festgelegte Kurvenverlauf ist die Summe von zwei (oder auch mehreren) Einzelkurven. Die theoretischen Geraden können in grober Annäherung extrapoliert werden. Von ROSENTHAL (1967) wurde dazu eine brauchbare Methode entwickelt, die in den meisten Fällen eine Bestimmung der Bindungsparameter mit ausreichender Genauigkeit ermöglicht. Wesentlich aufwendiger ist die Berechnung der Bindungsparameter durch Iteration mit einem Computer. Nach Vorgabe von graphisch ermittelten Näherungswerten wird die beste Anpassung an den Kurvenverlauf errechnet. Eine solche Computeranalyse wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Beld, Katholiken Universität, Nijmegen, durchgeführt. Offenbar liegen zwei Bindungsstellen vor. Die erste Dissoziationskonstante lag bei $5,0 \times 10^{-9}M$, die Bindungskapazität bei $6,3 \times 10^{-11}M$ (erste Bindungsstelle). Für die zweite Bindungsstelle wurde eine Dissoziationskonstante von $3,4 \times 10^{-7}M$ und eine Bindungskapazität von $1,1 \times 10^{-9}M$ ermittelt (Abb. 9). Nach der einfacheren graphischen Methode wurde in mehreren Versuchen an Rattenfettzellen eine mittlere Dissoziationskonstante für die erste Bindungsstelle von $5,9 \times 10^{-9}M$ berechnet. Diese Befunde

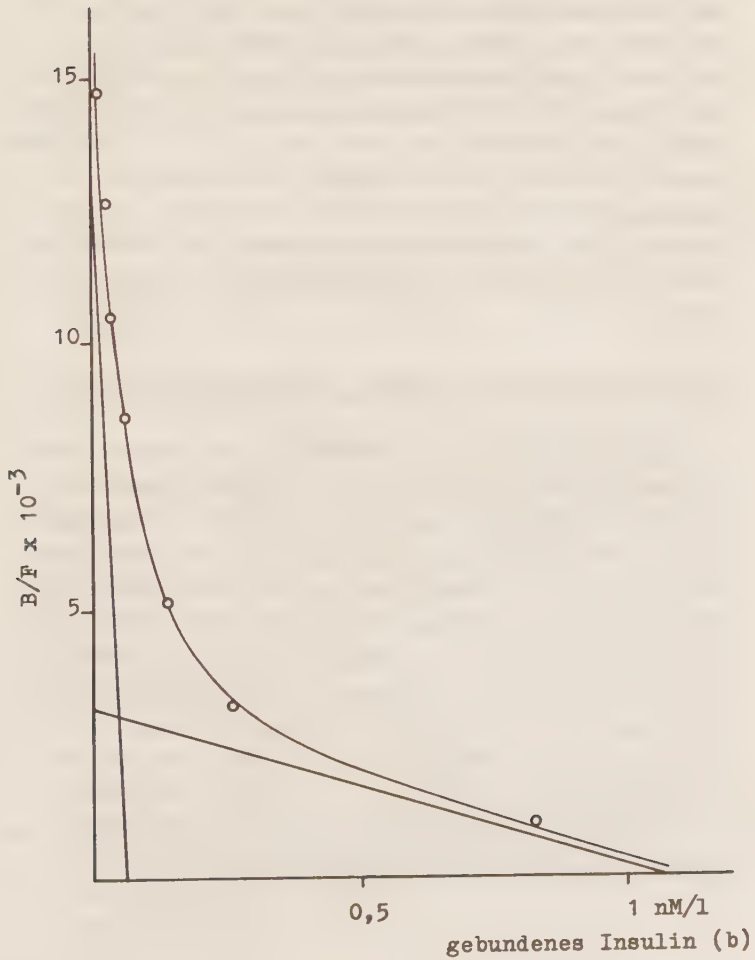


Abbildung 9:

Insulinbindung an Fettzellen, Scatchard-analyse

stehen weitgehend in Übereinstimmung mit entsprechenden Ergebnissen aus der Literatur (GAMMELTOFT und GLIEMANN, 1973).

Aus der Kapazität konnte annäherungsweise die Zahl der Bindungsstellen pro Zelle berechnet werden. Dabei wurde angenommen, daß eine Bindungsstelle jeweils nur ein Insulinmolekül bindet. Als mittlerer Durchmesser der Fettzellen wurden 50 μm angenommen. Damit ließ sich eine Zellzahl von $4,5 \times 10^6$ Zellen/ml Ansatz errechnen. Somit ergaben sich ungefähr 10^4 Bindungsstellen hoher Affinität pro Zelle. Dieses Ergebnis ist in etwa übereinstimmend mit Werten von HAMMOND et al. (1972) und GAMMELTOFT und GLIEMANN (1973).

Insulinrezeptoren von Maus, Hund, Katze und Affen

In prinzipiell ähnlicher Weise wie bei Ratten wurden auch Insulinrezeptoren an Fettzellen anderer Spezies wie Maus, Hund, Katze und Affe nachgewiesen. Bei der Maus fand ebenfalls parauterines Fettgewebe wie bei den Untersuchungen bei der Ratte Verwendung. Beim Hund, bei der Katze und beim Affen eignete sich das Fettgewebe aus dem Omentum majus. Die Inkubationsbedingungen mit radioaktivem Insulin waren die gleichen wie bei den Untersuchungen mit Ratten. Die Dissoziationskonstanten für die Insulinrezeptoren betrugen bei der Maus $4,2 \times 10^{-9}\text{M}$ und beim Hund $3,8 \times 10^{-9}\text{M}$. Sie liegen im Bereich der Dissoziationskonstanten der Insulinrezeptoren der Ratte.

3.1.2 Insulinrezeptoren an Lymphozyten

Außer an Fettzellen wurden Insulinrezeptoren auch an Lymphozyten bestimmt. Die Sedimentationsmethode erbrachte eine höhere Ausbeute an Leukozyten, enthielt aber insgesamt weniger Lymphozyten. Vom Kaninchen ließen sich Lymphozyten nur nach dem Verfahren nach BÖYUM isolieren, da sich die Erythrozyten nicht spontan absetzten. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengestellt.

Tabelle 1

Ausbeute an Leukozyten und Lymphozyten aus 50 ml Vollblut verschiedener Spezies

Spezies	Sedimentations- methode		Methode nach BÖYUM (1967)	
	Leuko- zyten ₇ x 10 ⁷	Lympho- zyten %	Leuko- zyten ₇ x 10 ⁷	Lympho- zyten %
Mensch	8 - 20	} ~50	6	} ~80
Hund	30		5 - 13	
Kaninchen	-		1 - 5	

Wegen des höheren prozentualen Anteils an Lymphozyten wurde für die weiteren Versuche die Methode nach BÖYUM angewandt. Ein Unterschied in den beiden Isolierungsverfahren ließ sich im Insulinbindungstest nicht nachweisen.

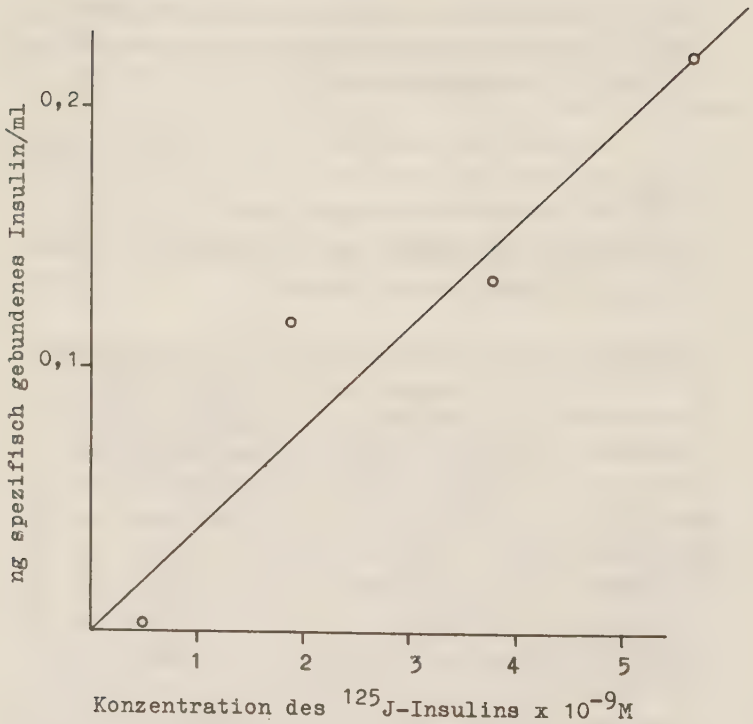


Abbildung 10:

Spezifische Insulinbindung an Lymphozyten in
Abhängigkeit von der Insulinkonzentration bei
 100×10^6 Zellen/ml

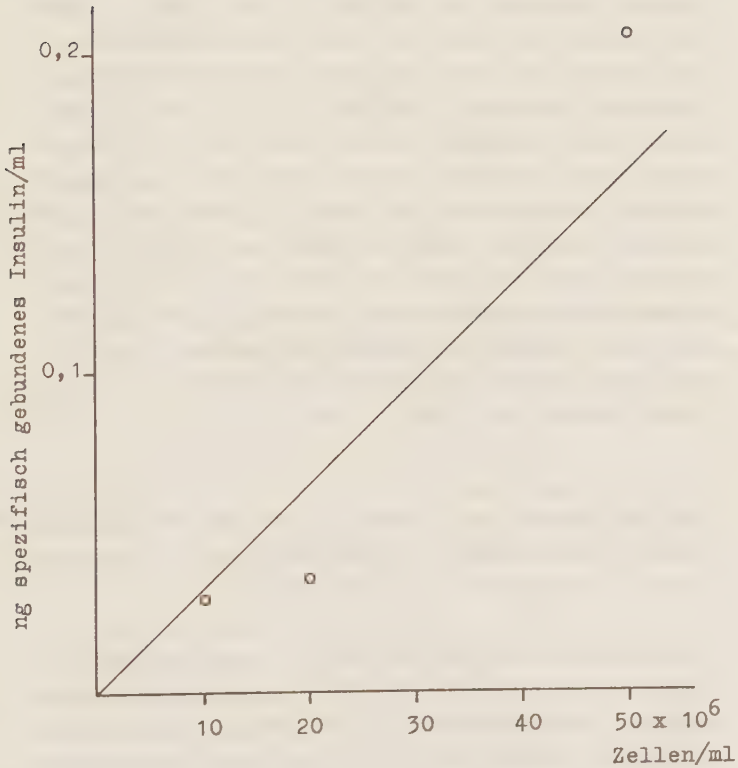


Abbildung 11:

Spezifische Insulinbindung an Lymphozyten in
Abhängigkeit von der Zellmenge im Bereich von
10 bis 50 x 10⁶ Zellen/ml

Der Anteil an spezifischer Bindung in diesen Experimenten wies von Versuch zu Versuch erhebliche Schwankungen auf. Maximal konnte bei Lymphozyten vom Menschen 45 %, vom Hund 25 % und vom Kaninchen 30 % spezifische Bindung gefunden werden. Diese Faktoren erwiesen sich als limitierend für weitere umfangreiche Untersuchungen. Dennoch wurde die Bindung bei mehreren Insulinkonzentrationen an Lymphozyten vom Hund gemessen. Bei Insulinkonzentrationen zwischen 0,05 und $6 \times 10^{-9} \text{M}$ zeigte die spezifische Bindung eine lineare Dosis - Abhängigkeit (Abb. 10). Die unspezifische Bindung lag höher als die spezifische. Die Schwierigkeit aus der Berechnung der Differenz zwischen zwei großen Zahlen präzise Werte zu erhalten, mußte auch bei der Bestimmung der spezifischen Bindung in Abhängigkeit von der Zellzahl berücksichtigt werden (Abb. 11). Bei einer Steigerung der Zellzahl über 5×10^7 Zellen/ml wurde die Bindung nicht wesentlich erhöht.

3.2 Prüfung einiger neuer Insulinderivate auf Bindung an den Fettzellrezeptor, an Antikörper sowie auf biologische Aktivität in vitro und in vivo

Die zu prüfende Insulinderivate lagen nicht in radioaktiv markierter Form vor. Darum mußte die Bindung am Insulinrezeptor durch Kompetitionskurven ermittelt werden. Die Affinität eines Derivats im Vergleich zum Rinderinsulin ergab sich aus dem Abstand beider Kompetitionskurven im linearen Bereich. Mit den vorliegenden Versuchsbedingungen ließen sich Unterschiede messen, die zu >50 % vom Rinderinsulin abweichen. Kleinere Differenzen waren nicht zu

erfassen.

Die Brauchbarkeit der Methode wurde zunächst mit solchen Substanzen überprüft, von denen zu erwarten war, daß sie keine Affinität zum Insulinrezeptor haben sollten. So konnte mit den A- und B-Ketten des Insulins keine Konkurrenz am Fettzellrezeptor gemessen werden (Tab. 2, Abb. 12).

Die Ergebnisse aus den Versuchen zur Messung der Bindungseigenschaften verschiedener Derivate sind in Tab. 3 und als Konkurrenzkurven in Abb. 12 dargestellt. Um die an verschiedenen Tagen durchgeführten Versuche miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte umgerechnet in Prozent der mit Rinderinsulin gemessenen maximalen spezifischen Bindung. Die Ergebnisse aus dem Rezeptortest zeigen, daß sämtliche modifizierte Insulinverbindungen nahezu dieselbe maximale Konkurrenz wie das Rinderinsulin aufweisen. Die beiden Insulinderivate, die am N-terminaten Ende der A- und B-Ketten durch Carbamoyl- (Nr. 1) oder Hydroxylgruppen (Nr. 2) substituiert sind, zeigten keinen wesentlichen Unterschied zum Rinderinsulin. Diacetylinulin (Nr. 3) hatte eine Bindungsaffinität, die auf ca. 10 % des Kontrollwertes abgesunken war. Eine noch ausgeprägtere Abnahme der Affinität, auf ca. 1 %, zeigte das Derivat Nr. 4. Diese Verbindung hatte eine umfangreiche Modifikation in der A-Kette. Das führt u.a. zum Verschwinden der intrachainaren Disulfidbrücke. Das aus dem Pankreas der Katze isolierte Insulin, hatte dieselbe Affinität zum Rezeptor wie das Rinderinsulin.

Tabelle 2

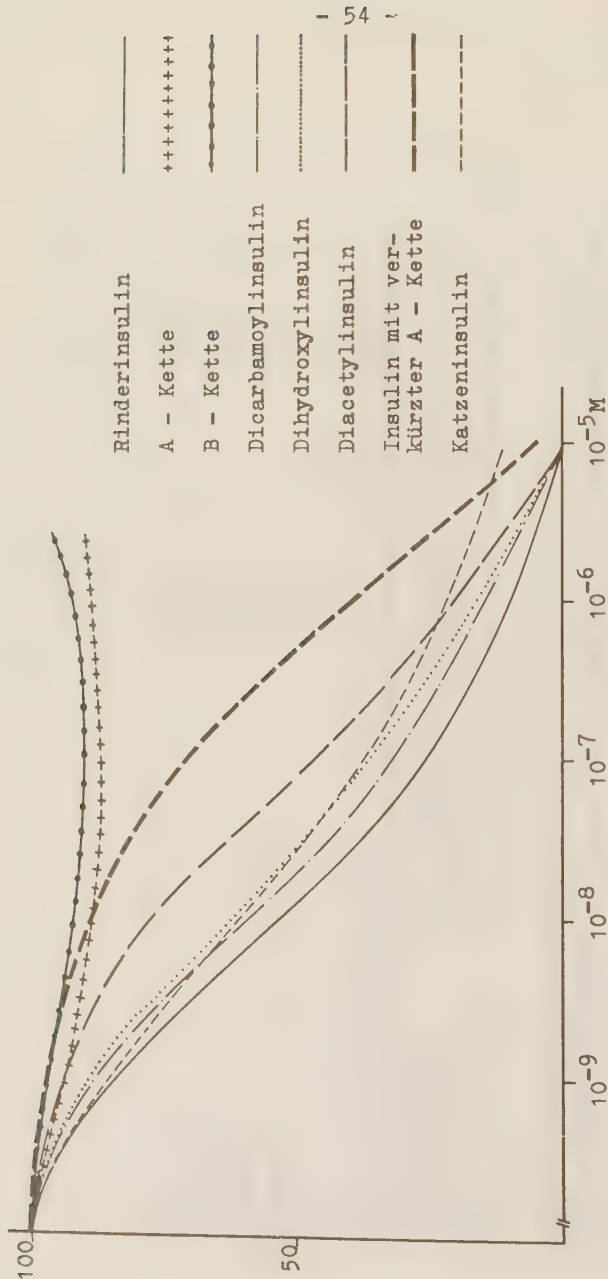
Die Bindung der A- und B-Ketten des Insulins an Fettzellen in % der Maximalbindung von Rinderinsulin.

A-Kette		B-Kette	
Konzentration (M)	Insulinbindung (% der Maximal- bindung von Rinderinsulin)	Konzentration (M)	Insulinbindung (% der Maximal- bindung von Rinderinsulin)
$2,1 \times 10^{-9}$	87	$1,4 \times 10^{-9}$	89
$2,1 \times 10^{-8}$	81	$1,4 \times 10^{-8}$	86
$2,1 \times 10^{-7}$	90	$1,4 \times 10^{-7}$	93
$2,1 \times 10^{-6}$	102	$1,4 \times 10^{-6}$	107
$2,1 \times 10^{-5}$	85	$1,4 \times 10^{-5}$	105

Tabelle 3

Die Bindung von Insulinderivaten und Katzeninsulin an Fettzellen in % der Maximalbindung von Rinderinsulin

Konzentration des nicht mar- kierten Insu- lins oder In- sulinderivats	Insulinbindung verschiedener Derivate (% der Maximalbindung von Rinderinsulin)					
	Rinder- insulin	Derivat Nr. 1	Derivat Nr. 2	Derivat Nr. 3	Derivat Nr. 4	Katzen- insulin
$0,83 \times 10^{-9}$	86	88	90	81	94	71
$0,83 \times 10^{-8}$	55	58	58	85	82	59
$0,83 \times 10^{-7}$	19	25	21	48	68	32
$0,83 \times 10^{-6}$	17	19	32	25	40	22
$0,83 \times 10^{-5}$	0	0	0	4	8	16



Konzentration von nicht markiertem Insulin bzw. Insulinderivat

Abbildung 12: Kompetitionskurven von vier geprüften Insulinderivaten, A- und B-Ketten des Insulins sowie des Katzeninsulins im Vergleich zum Rinderinsulin

Kompetition von markiertem Insulin in %
der maximalen spezifischen Bindung

Die biologische Aktivität in vitro wurde anhand der durch Insulin stimulierbaren Glukose-Oxydation am Fettgewebe der Ratte gemessen. In vivo wurde die Blutzucker-senkende Wirkung an der Ratte ermittelt und das Minimum der Blutzuckerwerte als Meßgröße gewählt. Die Bindung der Insulinderivate an Antikörper wurde ebenfalls mit Rinderinsulin verglichen. Zu diesem Zweck wurden Antikörper vom Meerschweinchen, die gegen Rinderinsulin erzeugt wurden, benutzt. Für die Glukose-Oxydation konnte eine Änderung um 50 % und für die beiden letzten Parameter um 25 % vom Rinderinsulinstandard erfaßt werden.

In Tab. 4 sind die Ergebnisse aus den Rezeptoranalysen sowie aus den Versuchen zur Messung der Bindung an Antikörper und der biologischen Aktivität zusammengestellt. Daraus wird sichtbar, daß die beiden Verbindungen Nr. 3 (Diacetylinulin) und Nr. 4 (Insulin mit verkürzter A-Kette), die in ihren Bindungseigenschaften am Fettzellrezeptor beeinträchtigt sind, ebenfalls eine geringere Bindung an Antikörper und eine geringere biologische Aktivität in vitro zeigten. Bei Nr. 1 (Dicarbamoylinulin) fiel die Rezeptorbindung kaum, die Glukose-Oxydation auf etwa die Hälfte des Rinderinsulinwertes ab. Die Blutzucker-senkende Wirkung war bei diesem Derivat unverändert gegenüber den Kontrollen. Beim Derivat Nr. 2 (Dihydroxyinsulin) scheint die Bindungsaffinität etwas mehr als beim Nr. 1 (Dicarbamoylinulin) beeinträchtigt zu sein. Auch die Glukose-Oxydation war deutlich erniedrigt. Die Blutzucker-senkende Wirkung war dieselbe wie beim Rinderinsulin. Die Acetylierung der Aminogrup-

Tabelle 4

Bindung am Rezeptor und an Antikörper, Glukose-Oxydation am Fettgewebe und Blutzuckersenkung insulinähnlicher Verbindungen relativ zum Rinderinsulin (100%).

Nr.	Substanz	Bindung am Rezeptor (%)	Bindung an Antikörper (%)	Glukose- Oxydation (%)	Blutzucker- senkung *) (%)
	Rinderinsulin	100	100	100	100
1	Dicarbamoylinsulin	50	12	50	93
2	Dihydroxyinsulin	50	11	4	79
3	Diacetylinsulin	10	22	6	n.b.
4	Insulin mit verkürzter A-Kette	1	3	1	4
5	Katzeninsulin	50	n.b.	50	100

*) Blutzuckerminima; Abk. n.b.: nicht bestimmt

pen an A1 und B1 (im Derivat Nr. 3) verursacht wieder eine markante Reduzierung sowohl in der Bindung als auch in der biologischen Aktivität in vitro. Die drei Derivate Nr. 1, 2 und 3 zeigten eine auf etwa ein Zehntel herabgesetzte Bindung an Antikörper. Die Verkürzung in der A-Kette im Derivat Nr. 4 senkte die Bindungseigenschaften am Fettzellrezeptor und an Antikörper wie auch die biologische Wirkung in vitro auf etwa 1 bis 3 % des Rinderinsulins. Die Blutzucker-senkende Wirkung war ebenfalls stark beeinträchtigt. Katzeninsulin ergab weder in der Bindung am Fettzellrezeptor noch in der Glukose-Oxydation oder der Blutzucker-senkenden Wirkung Unterschiede zum Rinderinsulin.

3.3 Insulinbindung an Fettzellen bei der Fettsucht, nach Behandlung mit Clomegestonacetat, Cyproteronacetat und Insulin

3.3.1 Fettsucht bei der Maus

Mäuse mit genetisch bedingter Fettsucht weisen u.a. eine ausgeprägte Insulinresistenz auf. Sie ist charakterisiert durch Hyperglykämie bei gleichzeitig auftretender Hyperinsulinämie. Bei einem kleinen Kollektiv von drei Monate alten weiblichen fett-süchtigen ob/ob-Mäusen wurden Körpergewicht, Blutzucker und Seruminsulin bestimmt. Als Kontrolle dienten drei Monate alte weibliche normalgewichtige Mäuse vom Stamm NMRI. Die für diese Fettsucht typischen Abweichungen von den normalen Tieren wurden bestätigt (Tab. 5).

Tabelle 5

Körpergewicht, Seruminsulin und Blutzucker bei 16 Stunden nüchternen Mäusen mit genetisch bedingter Fettsucht (ob/ob) und normalgewichtigen Kontrollen.

Kollektiv	Körpergewicht (g)	Seruminsulin (μ E/ml)	Blutzucker (mg/100 ml)
Fettsüchtige Tiere, n = 3	50 $\pm$ 1	185 $\pm$ 63	84 $\pm$ 25
Kontrollen, n = 4	29 $\pm$ 1	24 $\pm$ 4	56 $\pm$ 6

$$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$$

Von den ob/ob-Mäusen und den Kontrollen wurden Fettzellen isoliert und Insulinbindungsstellen gemessen. Dabei stellte sich in drei getrennt durchgeführten Versuchen heraus, daß die fettsüchtigen Mäuse eine deutlich herabgesetzte Insulinbindung haben. In Abb. 13 sind die Werte aus diesen Versuchen wiedergegeben. Für die spezifische Bindung ergab sich ein Durchschnittswert von 5 pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew. und für die Kontrollen 39,8 pg gebundenes Insulin/mg Tr. Gew.

Wegen der unterschiedlichen Größe der Fettzellen war es von Interesse, nicht nur die Bindung auf das Trockengewicht, sondern auch auf die Zellzahl zu beziehen. Da bei steigendem Fettzelldurchmesser Volumen und Gewicht der Zellen stärker zunehmen

als die Zelloberfläche, könnte das Zelltrockengewicht als Bezugsgröße irreführende Werte liefern. Wurden die Werte der Bindung pro Zellzahl berechnet, so ergab sich eine spezifische Bindung von $0,38 \text{ pg gebundenes Insulin}/10^6 \text{ Zellen}$ für die ob/ob-Mäuse, der entsprechende Wert für die Kontrolltiere betrug dann $0,61 \text{ pg gebundenes Insulin}/10^6 \text{ Zellen}$ (Abb. 13 b). Obwohl der Unterschied zu den Kontrollen nicht mehr so deutlich ausgeprägt ist, bleibt die spezifische Bindung bei fettsüchtigen Tieren, auch auf die Zellzahl bezogen, noch auf knapp die Hälfte reduziert. Da die Werte einer beträchtlichen Streuung unterliegen, ließ sich der Unterschied statistisch nicht sichern.

Wegen der niedrigen spezifischen Bindung und der relativ wenigen Kurvenpunkte war die Ermittlung der Dissoziationskonstanten aus der Scatchard-Gleichung bei den ob/ob-Mäusen schwierig. Zur Berechnung gelangen nur Differenzen zwischen zwei großen Zahlen, die naturgemäß mit einem großen Fehler behaftet sind. Trotzdem ließen sich die wichtigsten Parameter abschätzen. Die Dissoziationskonstante der Bindungsstelle mit hoher Affinität lag bei ob/ob-Mäusen durchschnittlich bei $6 \times 10^{-9} \text{ M}$ und war damit praktisch nicht verschieden von der der Kontrolltiere, $7 \times 10^{-9} \text{ M}$. Die Bindungskapazität war dagegen erniedrigt, was mit einer herabgesetzten Anzahl von Rezeptoren zu erklären ist.

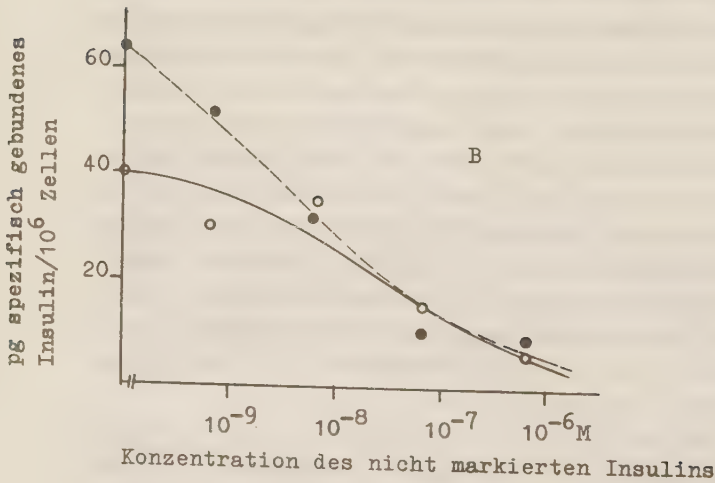
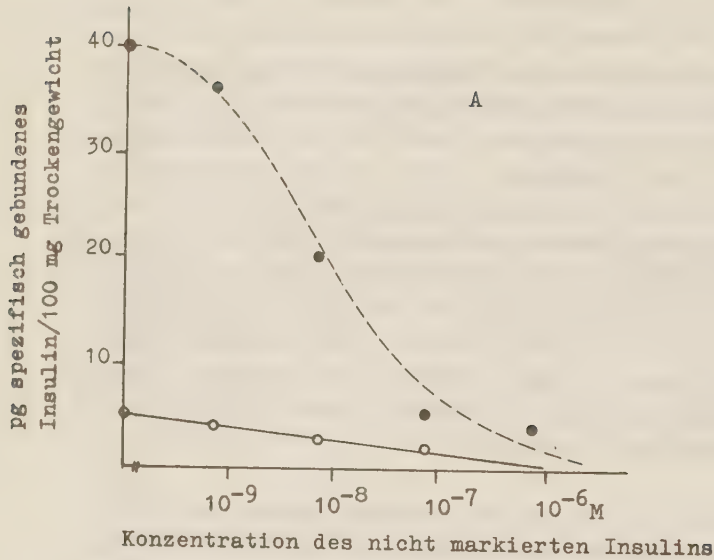


Abbildung 13:

Insulinbindung an Fettzellen genetisch fettsüchtiger Mäuse (ob/ob—○—) und deren Kontrollen (+/+---●---) Konkurrenzkurven, Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, spezifische Bindung bezogen auf das Trockengewicht (A) und auf die Zellzahl (B)

3.3.2 Behandlung mit Clomegestonacetat

Die subkutane Behandlung von Ratten mit dem synthetischen Gestagen Clomegestonacetat führt in Dosierungen von 2,5 und 8 mg/kg zu einer Insulinresistenz (SCHILLINGER et al., 1974). Als Ergänzung zu den Versuchen dieser Autoren wurde ein Insulinbelastungstest nach Behandlung mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat durchgeführt. Die Insulin- und Blutzuckernüchternwerte waren nach Gestagenbehandlung nicht verändert (Tab. 6). Nach der Injektion von 300 mE Insulin pro kg Körpergewicht lagen die Insulinkonzentrationen im Serum der behandelten Tiere nach 10 Minuten nur unwesentlich höher. Nach 20 Minuten war das Insulin im Serum jedoch nicht auf den Wert der Kontrollen abgefallen. Dieser Unterschied ist signifikant. Die Blutzuckerwerte waren während des ganzen Experiments praktisch nicht verschieden von den Kontrollen. Aus diesem Versuch wird deutlich, daß die erhöhten Insulinspiegel nicht zu einer verstärkten Senkung der Glukosespiegel im Blut führen. Das läßt sich auch anhand des Quotienten aus Insulin/Glukose demonstrieren. Nach Gestagenbehandlung lag der Wert nach 20 Minuten höher als der entsprechende Kontrollwert. Der Versuch bestätigte das Auftreten einer Insulinresistenz nach Clomegestonacetatbehandlung. Er zeigt außerdem, daß nach dieser Behandlung der Abbau einer definiert zugegebenen Menge an Insulin im Organismus verlangsamt ist.

Die Auswirkungen einer Gestagenbehandlung auf die Insulinrezeptoren wurde in den folgenden Versuchen charakterisiert. Ratten wurden bis zu 36 Tagen mit Clomegestonacetat zunächst in der Dosierung von

Tabelle 6

Beeinflussung der Blutzucker- und Seruminsulinspiegel nach 13tägiger s.c. Behandlung mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat. Intravenöse Insulinbelastung an 16 Stunden nüchternen weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 180 - 200 g.

Kollektiv	Minuten nach Verabreichung von 300 mE Insulin/kg							
	0			10			20	
	Blut- zucker mg/100 ml	Insu- lin µE/ml	Insulin/ Blut- zucker	Blut- zucker mg/100 ml	Insu- lin µE/ml	Insulin/ Blut- zucker	Blut- zucker mg/100 ml	Insu- lin µE/ml
Kontrollen	70 ±2	20 ±2	0,29	52 ±2	158 ±15	3,04	37 ±2	43 ±5
Clomege- stonacetat	73 ±4	17 ±2	0,23	58 ±6	184 ±27	3,20	42 ±5	116 ^{*)} ±32
								1,17
								2,80

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 10; *) p = 0,05

2,5 mg/kg täglich subkutan behandelt. Diese Dosis führte zu keinen signifikanten Veränderungen im Blutzucker und Seruminsulin gefütterter Tiere. In der Tendenz schien sich jedoch ein schwacher Anstieg des Seruminsulins als Zeichen einer sich ausbildenden Insulinresistenz abzuzeichnen (Tab. 7). Unter der Behandlung war das Körpergewicht der behandelten Tiere gegenüber den Kontrollen nicht verändert. Die spezifische Bindung an Fettzellen war nach Gestagenbehandlung etwas niedriger als bei den Kontrollen (Tab. 8).

Um deutlichere Effekte zu erzielen, wurde der Versuch mit einer höheren Gestagendosis wiederholt. Während der Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat war der Blutzucker gefütterter Ratten wie im vorigen Versuch praktisch unverändert. Die Insulinspiegel im Serum waren jedoch bei gleichbleibender Glukosekonzentration nach 6, 9 und 12 Behandlungstagen durchschnittlich um etwa 40 % erhöht (Tab. 9). Das Körpergewicht wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst.

Da eine Behandlung mit einer geeigneten Gestagendosis zu Gewichtszunahme und Hypertrophie der Fettzellen führen kann (SALANS et al., 1970), wurde der Einfluß von Clomegestonacetat auf die Fettzellgröße geprüft. Eine Messung des Zelldurchmessers nach 9tägiger Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat ergab für die behandelten Ratten ein Wert von $69 \pm 2 \mu\text{m}$ und für die Kontrollen ein Wert von $63 \pm 2 \mu\text{m}$. Die beiden Werte unterschieden sich nicht voneinander. Das Trockengewicht erwies sich somit als eine geeignete Bezugsgröße bei der Messung der Insu-

Tabelle 7

Blutzucker und Seruminsulin aus gefütterten weiblichen Ratten, die bis zu 36 Tage lang täglich mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat s.c. behandelt worden waren, Körpergewicht 180 - 220 g.

Behandlungs- dauer (Tage)	Blutzucker (mg/100 ml)		Seruminsulin (μ E/ml)	
	Kontrollen	Behandelt	Kontrollen	Behandelt
12	83 $\pm$ 5	113 $\pm$ 3	41 $\pm$ 5	41 $\pm$ 3
24	108 $\pm$ 15	99 $\pm$ 5	34 $\pm$ 1	43 $\pm$ 1
30	106 $\pm$ 1	106 $\pm$ 2	43 $\pm$ 5	39 $\pm$ 6
36	95 $\pm$ 5	88 $\pm$ 4	38 $\pm$ 4	38 $\pm$ 5

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n : 3 - 5

Tabelle 8

Spezifische Insulinbindung an Fettzellen weiblicher Ratten nach 36tägiger s.c. Behandlung mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat.

Behandlungsdauer (Tage)	Spezifische Bindung (pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew.)	
	Kontrollen	Behandelt
6	7 $\pm$ 2	4 $\pm$ 1
12	11 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2
18	6 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1
24	11 $\pm$ 1	7 $\pm$ 1
36	6 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n : 3

Tabelle 9

Blutzucker und Seruminsulin aus gefütterten weiblichen Ratten, die bis zu zwölf Tage lang täglich mit 8 mg/kg Clomegestonacetat s.c. behandelt worden waren, Körpergewicht 160 - 200 g.

Behandlungsdauer (Tage)	Blutzucker (mg/100 ml)		Seruminsulin (μ E/ml)	
	Kontrollen	Behandelt	Kontrollen	Behandelt
6	84 $\pm$ 6	90 $\pm$ 1	31 $\pm$ 3	41 $\pm$ 8
9	94 $\pm$ 1	103 $\pm$ 2	25 $\pm$ 3	42 $\pm$ 5
12	95 $\pm$ 3	97 $\pm$ 5	41 $\pm$ 7	75 $\pm$ 4
9	n.b.	n.b.	47 $\pm$ 13	96 $\pm$ 6

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n: 3 - 5; *) Wiederholungsversuch

Tabelle 10

Spezifische Insulinbindung an Fettzellen weiblicher Ratten nach 18tägiger s.c. Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat.

Behandlungsdauer (Tage)	Spezifische Bindung (pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew.)	
	Kontrollen	Behandelt
6	22 $\pm$ 3	11 $\pm$ 4
9	36 $\pm$ 3	11 $\pm$ 3
12	12 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1
15	16 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2
18	19 $\pm$ 1	13 $\pm$ 2
9 ^{*)}	16 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n: 3

*) Wiederholungsversuch

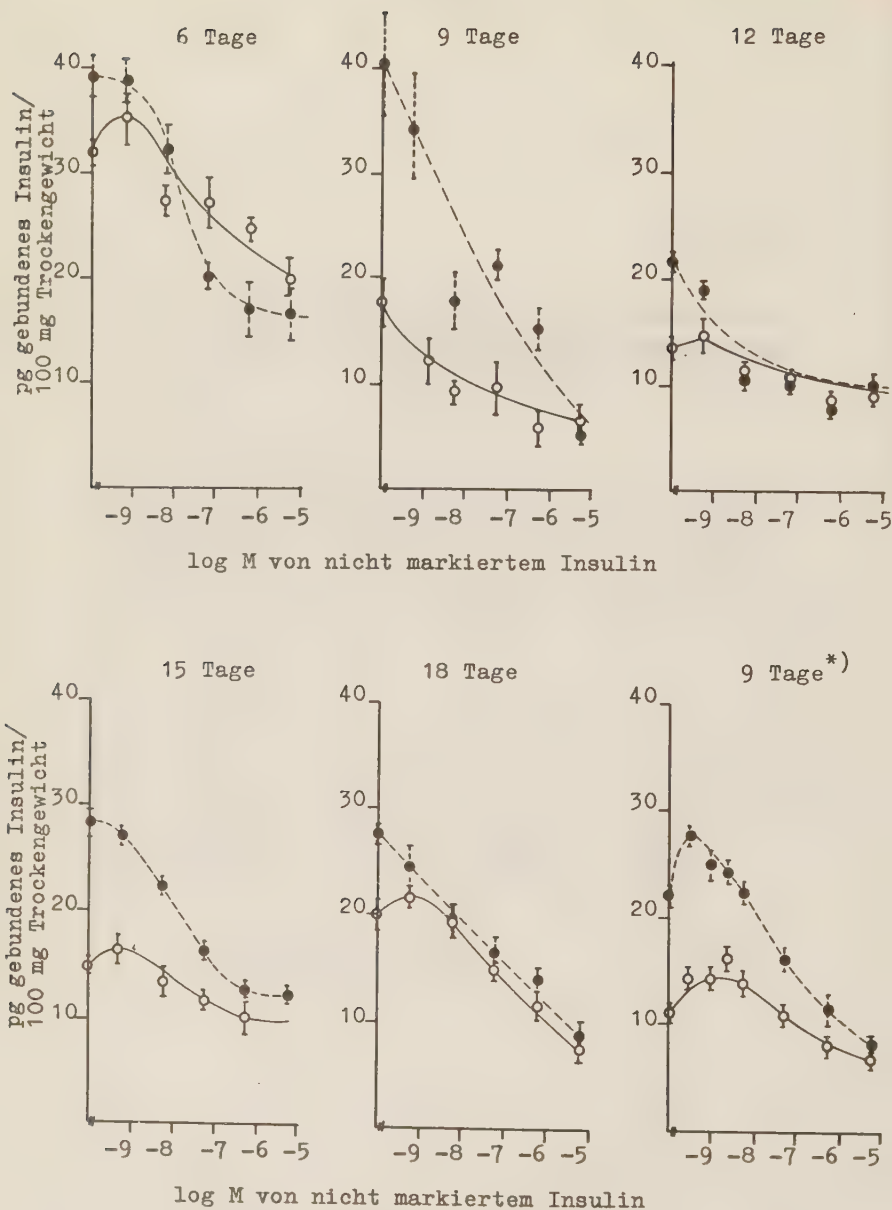


Abb. 14

Insulinbindung an Fettzellen, Konkurrenzkurven nach täglicher Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat (—○—) und entsprechende Kontrollen (---●---); $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 3
 *) Wiederholungsversuch

linbindung.

In Tab. 10 sind die Werte für die spezifische Bindung zusammengefaßt. Daraus wird ersichtlich, daß zu jedem untersuchten Zeitpunkt eine Reduktion der Insulinbindung feststellbar ist. Die maximale Reduzierung der spezifischen Bindung auf 30 % des entsprechenden Kontrollwertes wurde nach 9 Tage Behandlung gemessen. Die statistische Prüfung aller Einzelergebnisse nach Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat ergab im Wilcoxon-Test (einseitig) einen signifikanten Unterschied auf dem 0,05-Niveau.

Zusätzlich sind die Kompetitionskurven für die Insulinbindung in Abb. 14 summarisch zusammengestellt. Die Kurven wurden nach SCATCHARD umgeformt. Genau wie bei den ob/ob-Mäusen veränderte sich die Dissoziationskonstante des Insulinrezeptors mit hoher Affinität nicht. Sowohl für die behandelten Tiere als auch für die Kontrollen wurde ein Wert von $7 \times 10^{-9} \text{M}$ gefunden. Die Kapazität nahm jedoch in allen Versuchen ab. Die herabgesetzte Bindung nach Clomegestonacetatbehandlung ist offensichtlich nicht durch eine veränderte Affinität sondern durch eine verringerte Anzahl an Bindungsstellen gegenüber den Kontrollen zu erklären.

3.3.3 Behandlung mit Cyproteronacetat

Das mit Clomegestonacetat strukturell verwandte Cyproteronacetat leitet sich ebenfalls vom 17 α -Hydroxyprogesteron ab. In seiner biologischen Wirkung, gemessen im Claubergtest am Kaninchen oder an der Ovulationshemmung bei der Ratte, hat

Tabelle 11

Beeinflussung der Blutzucker- und Seruminsulinspiegel nach 11tägiger s.c. Behandlung mit 2 mg/kg Cyproteronacetat. Intravenöse Glukosebelastung mit 1 g Glukose/kg an 16 Stunden nüchternen weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 160 - 180 g.

Kollektiv	Minuten nach Verabreichung von 1 g Glukose/kg							
	0			10		20		
	Blut- zucker mg/100 ml	Insu- lin µE/ml	Insulin/ Blut- zucker	Blut- zucker mg/100 ml	Insu- lin µE/ml	Insulin/ Blut- zucker	Blut- zucker mg/100 ml	Insu- lin µE/ml
Kontrollen	52 ± 4	14 ± 1	0,27	300 ± 9	79 ± 9	0,26	241 ± 12	52 ± 5
Cyproteron- acetat	70 ^{*)} ± 2	13 ± 1	0,19	276 ± 8	70 ± 9	0,25	219 ± 12	36 ^{**)*)} ± 4
								0,22
								0,16

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 10; *) p = 0,1, **) p = 0,05,

Tabelle 12

Glukose und Insulin im Serum von gefütterten weiblichen Ratten, die bis zu 17 Tage lang täglich mit 2 mg/kg Cyproteronacetat s.c. behandelt worden waren, Körpergewicht 170 - 210 g.

Behandlungsdauer (Tage)	Glukose (mg/100 ml Serum)		Seruminsulin (μ E/ml)	
	Kontrollen	Behandelt	Kontrollen	Behandelt
8	178 $\pm$ 6	191 $\pm$ 6	47 $\pm$ 9	68 $\pm$ 13
11	177 $\pm$ 12	170 $\pm$ 8	53 $\pm$ 15	47 $\pm$ 6
14	160 $\pm$ 4	172 $\pm$ 14	36 $\pm$ 6	31 $\pm$ 3
17	172 $\pm$ 3	171 $\pm$ 6	n.b.	50 $\pm$ 11

$$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}, n = 3$$

sich dieses Gestagen als ebenso wirksam erwiesen wie Clomegestonacetat (NEUMANN, unveröffentlicht). Es lagen jedoch Anhaltspunkte am Hund und Kaninchen vor, daß diese Substanz keine oder zumindest eine weniger stark ausgeprägte Insulinresistenz erzeugt.

Um dies näher zu prüfen, wurden weibliche Ratten elf Tage lang mit 2 mg/kg Cyproteronacetat subkutan behandelt. Anschließend wurde ein intravenöser Glukosetoleranztest durchgeführt. Wie aus Tab. 11 ersichtlich wird, hatte Cyproteronacetat keinen Einfluß auf die Glukosetoleranz. Der Glukoseabstrom aus dem Blut war bei den behandelten Tieren sogar eher verbessert. Der Nüchternwert (0 Minuten) der Glukose war erhöht. Das Insulin im Serum war im Nüchternzustand und 10 Minuten nach der Glukoseinjektion unverändert. Nach 20 Minuten lagen die Insulinwerte im Serum sogar noch niedriger. Der insulinogene Quotient lag nach Gestagenbehandlung ebenfalls eher niedriger als bei den Kontrollen.

Zur Messung der Insulinbindungsstellen wurden Versuche durchgeführt an Ratten, die 8, 11, 14 und 17 Tage lang mit 2 mg/kg Cyproteronacetat subkutan behandelt worden waren. Dies entsprach der Dosis, die im Gegensatz zum Cyproteronacetat beim Clomegestonacetat im Glukosetoleranztest und im Insulinbelastungstest bereits zur Insulinresistenz geführt hatten. Tab. 12 zeigt die Werte für Glukose und Insulin im Serum der gefütterten Tiere. Die Glukose wurde im Gegensatz zu den früheren Versuchen aus dem Serum bestimmt. Deshalb liegen die Werte höher. Weder in den Glukose- noch in den Seruminsulinwerten

Tabelle 13

Spezifische Insulinbindung an Fettzellen weiblicher Ratten nach 17tägiger s.c. Behandlung mit 2 mg/kg Cyproteronacetat

Behandlungsdauer (Tage)	Spezifische Bindung (pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew.)	
	Kontrollen	Behandelt
8	8 ± 1	5 ± 2
11	7 ± 2	5 ± 2
14	14 ± 2	11 ± 2
17	12 ± 2	9 ± 1

$\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, n = 3

lagen Unterschiede zwischen behandelten und Kontrolltieren vor.

Der mittlere Durchmesser der Fettzellen wurde nach Cyproteronacetatbehandlung festgestellt. Mit $63^{+3} \mu\text{m}$ nach 11 und 14 Tage für die behandelten, und 53^{+3} und $63^{+3} \mu\text{m}$ für die Kontrollen, lagen keine Unterschiede vor.

Die Ergebnisse aus dem Bindungstest sind in Tab. 13 aufgeführt. Trotz der hohen Streuung zeichnete sich in allen Versuchen eine Herabsetzung der spezifischen Insulinbindung um etwa 30 % ab. Die Dissoziationskonstante und die Bindungskapazität der ersten Bindungsstelle wurde im Versuch nach 14tägiger Behandlung berechnet. Wieder ergaben sich zwischen behandelten und Kontrolltieren übereinstimmende Werte für die Dissoziationskonstante. Dagegen war die Bindungskapazität nach Behandlung mit Cyproteronacetat auf etwa 60 % des Kontrollwertes abgesunken. Das deutet darauf hin, daß ähnlich wie bei Clomegestonacetat die herabgesetzte Bindung auf eine verringerte Zahl Bindungsstellen zurückzuführen ist.

3.3.4 Behandlung mit Insulin

Zur Prüfung des Einflusses einer Insulinbehandlung auf die Insulinrezeptoren wurden Ratten 13 Wochen lang mit Alt-Insulin^(R) behandelt. Die Dosis betrug in den ersten vier Wochen 1 I.E./kg, für die restlichen neun Wochen wurde sie auf 1 I.E./Tier erhöht. Die Tiere zeigten eine normale Gewichtsentwicklung. Da die Ratten etwa zwei Stunden nach der letzten Applikation des Insulins getötet wurden, lagen die

Insulinwerte der behandelten Ratten im Durchschnitt mit 300 ± 100 μ E/ml im Vergleich zu den Kontrollen mit 38 ± 4 μ E/ml noch sehr hoch.

Die spezifische Bindung an den Fettzellen dieser Tiere wurde in zwei getrennten Versuchen gemessen. Es ergab sich dabei für die behandelten Ratten ein Durchschnittswert von 8 ± 1 pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew. Für die Kontrolltiere wurde eine spezifische Bindung von 9 ± 2 pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew. gemessen. Offensichtlich hat die Behandlung keine Veränderungen in der Insulinbindung bewirkt. Außerdem zeigen die Versuche, daß trotz der noch hohen Insulinkonzentrationen im Serum die Rezeptoren nach der Isolierung der Fettzellen weitgehend unbesetzt sind.

Da Insulin bei der Ratte relativ rasch abgebaut wird, lag die Vermutung nahe, daß die Verweildauer des Alt-Insulins^(R) im Körper nicht ausreicht, um einen Effekt auf die Insulinrezeptoren zu erzielen. Aus diesem Grunde wurde ein weiteres Tierkollektiv mit Insulin in einer Depot-Form (Depot-Insulin^(R)) behandelt, das eine über einen längeren Zeitraum verteilte Abgabe des Insulins gewährleistet. Die Verabreichung von 8 I.E./kg Depot-Insulin^(R) erfolgte in zwölfstündigen Abständen. Nach fünf Tagen wurden die Tiere getötet und die spezifische Bindung von Insulin an Fettzellen geprüft. Unter dem Mikroskop erwiesen sich die Fettzellen beider Gruppen als gleich groß. Nach Verabreichung des Depot-Insulins^(R) zeigte sich eine nur leichte Abschwächung der Insulinbindung. Die Werte der spezifischen Bindung an Fettzellen der behandelten Ratten lagen bei 26 ± 3 , der Kontrollen

bei 33^{+4} pg gebundenes Insulin/100 mg Tr. Gew. Die Werte unterscheiden sich nicht wesentlich von einander.

4.1 Methodische Probleme

Für eine Rezeptoranalyse werden außer einem geeigneten Gewebe oder einer entsprechenden Gewebefraktion radioaktiv markiertes Hormon mit hoher spezifischer Aktivität gebraucht. Die Herstellung von radioaktiv markierten Peptid- und Proteohormonen ist am einfachsten mit Jod-Isotopen zu erreichen. Die Einführung eines Jodatoms kann zu sterischen und damit zu physikalisch-chemischen Veränderungen des Moleküls führen und eine Reduktion der Affinität zum Rezeptor zur Folge haben (GARRATT et al., 1972; HAMLIN und ARQUILLA, 1974). Darum wird auch im Falle des Insulins angestrebt mit Insulinpräparationen zu arbeiten, die möglichst wenig Jod enthalten. In Versuchen von FREYCHET et al. (1971a) erwies sich eine Mono-Jod-Insulinpräparation im Vergleich zu nicht jodiertem Insulin (gemessen an der Glukose-Oxydation) als biologisch voll wirksam. GAMMELTOFT und GLIEMANN (1973) schließen aus Bindungsanalysen, daß die Affinität durch Einführung von 0,1 - 0,2 Jodatommen pro Insulin-Monomer nicht beeinträchtigt wird. Nach FREYCHET et al. (1971a) sind 96 % der markierten Insulinmoleküle einer solchen Präparation Mono-Jod-Insulin. Ein anderes Ergebnis erhielt dagegen YIP (1972) in Rezeptorstudien mit Lebermembranen, bei denen die Bindungsfähigkeit von ^3H -markiertem Insulin mit ^{131}J -Insulin verglichen wurde. Mit Tritium markiertem Insulin wurde bei 0°C mehr Insulin gebunden und das Maximum an Bindung schneller erreicht. Ein Einfluß auch geringer Mengen von Jod auf

die Bindungseigenschaften des Insulins kann somit nicht ausgeschlossen werden.

Die Reinheit des markierten Insulins war gelelektrophoretisch geprüft worden. Abgesehen von Spuren von Proinsulin wurde neben Insulin eine Fraktion gefunden, die sich wie Desamidoinsulin verhielt. Da diese Verbindung im Mäusekrampf test die gleiche biologische Aktivität wie Insulin hat (CHRAMBACH und CARPENTER, 1960; CARPENTER und CHRAMBACH, 1962), wurde sie jedoch als nicht störend angesehen. Die Präparation enthielt außerdem markiertes Material, das nicht genauer identifiziert werden konnte.

Gebundenes und ungebundenes Hormon müssen bei der Rezeptoranalyse voneinander getrennt werden. Das Arbeiten mit ganzen Zellen anstatt etwa mit Membranen erweist sich bei der Wahl der Trennmethode als eine Begrenzung. So sind Methoden wie z.B. Gelfiltration oder Dünnschichtchromatographie grundsätzlich ausgeschlossen. Bei einer Trennung durch Filtration können bei Bindungsanalysen dadurch zusätzlich Fehler auftreten, daß auch das ungebundene Hormon am Filter haften bleibt, wie von CUATRECASAS (1975) am Beispiel des Glukagons gezeigt wurde. Die Trennmethode von GLIEMANN et al. (1972) - eine rasche Zentrifugation der Fettzellen durch Phthalsäuredinonylester - zeichnet sich u.a. dadurch aus, daß nicht mit einer Dissoziation des Insulins von dem Rezeptor zu rechnen ist. Daß die jeweils gemessene Radioaktivität nur von den Zellen stammt, war durch entsprechende Kontrollversuche sichergestellt worden. In der Phthalsäuredinonylester-Phase, die außer den Zellen teilweise mitgemessen wird, konnte keine

Radioaktivität gefunden werden.

Die Bindung zeigte eine deutliche Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur. Die gemessenen Werte bei 23°C stimmen mit den Ergebnissen anderer Autoren, die bei 20°C inkubiert hatten, überein (GAVIN et al., 1972; KAHN et al., 1974; OLEFSKY und REAVEN, 1974a; GAMMELTOFT, 1975). Die Ursache für die Abnahme bei 37°C könnte ein Abbau sowohl von Insulin als auch von den Rezeptoren selbst sein. Bei 23°C konnte dagegen nach 90 Minuten keine Abnahme in der Bindung festgestellt werden, d.h. die Rezeptoren und das Insulin waren noch intakt. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich die Reaktion offensichtlich auch im Gleichgewicht.

Nachdem gezeigt worden war, daß die Insulinbindungsreaktion einen reversiblen Prozeß darstellt, war es erlaubt die aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitete Gleichung nach SCATCHARD (1949) zur Berechnung von Bindungsparameter anzuwenden. Dabei wurden zwei Bindungsstellen ermittelt. Sie haben unterschiedliche Affinitäten und sind in unterschiedlichen Mengen vorhanden. Bereits frühere Untersuchungen an Membranpräparationen der Leber der Maus und Ratte, Herzmuskel- und Fettgewebe der Maus, Plazenta des Menschen sowie Untersuchungen an intakten Zellen wie Fettzellen der Ratte, Thymozyten der Maus, Lymphozyten aus Zellkulturen oder aus dem peripheren Blut des Menschen ergaben, daß es für Insulin mindestens zwei Bindungsstellen mit vergleichbaren Eigenschaften gibt (HAMMOND et al., 1972; GAVIN et al., 1973; GAMMELTOFT und GLIEMANN, 1973; KAHN et al., 1973; 1974; OLEFSKY und REAVEN, 1974a; POSNER, 1974a; SOLL et al., 1974; KERN, 1975).

Die Affinität eines biologisch relevanten Rezeptors sollte gleich oder größer, aber keineswegs kleiner sein, als man aus den Insulinkonzentrationen im Blut erwarten kann. Die Insulinspiegel im Serum von Ratten dürften nach Futteraufnahme bei ca. $100 \mu\text{E/ml}$ liegen. Dies entspricht einer Konzentration von etwa $1 \times 10^{-9}\text{M}$. Dieser Wert liegt größenordnungsmäßig im Bereich der Dissoziationskonstanten von $5 \times 10^{-9}\text{M}$ für die Bindungsstelle mit hoher Affinität (erste Bindungsstelle).

Die Dissoziationskonstanten aus der Literatur zeigen keine nennenswerte Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben oder Spezies. Auch in den eigenen Untersuchungen an der Ratte und der Maus, aber auch am Hund, lagen die Dissoziationskonstanten im Bereich von 10^{-9}M .

Bei der zweiten Bindungsstelle lag die Dissoziationskonstante bei $3 \times 10^{-7}\text{M}$. Um eine physiologisch bedeutsame Reaktion mit dieser Bindungsstelle einzugehen, müßte das Seruminsulin in Konzentrationen von etwa 40 mE/ml vorliegen. Es ist schwer vorstellbar, daß diese Bindungsstelle unmittelbar an der biologischen Hormonreaktion beteiligt ist. Häufig werden die Bindungsstellen mit niedriger Affinität als überschüssig angesehen. Diese sogenannten "spare receptors" könnten durch negative Kooperativität entstanden sein. Der Begriff "negative Kooperativität" wurde von MONOD et al. (1965) geprägt und könnte nach DE MEYTS et al. (1973; 1976) auch für die Insulinbindungsstellen charakteristisch sein. Danach könnte durch die Besetzung eines Teils der Rezeptoren die Affinität des anderen Teils verringert werden. Nach JERUMS und GALTON (1974)

könnten die Rezeptoren mit niedriger Affinität Insulineffekte vermitteln, die nur bei außergewöhnlich hohen Insulinkonzentrationen verzeichnet werden können. Ein typisches Beispiel dafür ist eine lipolytische Wirkung von Insulin, die nach JACOBSSON und SMITH (1972) bei Insulinkonzentrationen von mehr als $10^4 \mu\text{E/ml}$ (entsprechend 10^{-7}M) im menschlichen Fettgewebe in vitro auftritt. Da Rezeptor-gebundenes Insulin nach FREYCHET et al. (1972a) nicht abgebaut wird, könnten die "spare receptors" auch die Funktion haben, Insulin bei hohen Konzentrationen aus dem Blut abzufangen und vor Abbau zu schützen (GLIEMANN et al., 1975). Außerdem könnten die Rezeptoren mit niedriger Affinität Vorstufen für die biologisch relevanten Bindungsstellen darstellen.

Die Dissoziationskonstanten können auch mit den Insulinkonzentrationen in Beziehung gesetzt werden, die in vitro für hormonstimulierte Reaktionen benötigt werden. Erstaunlicherweise ergibt sich für die halbmaximale Stimulierung der insulinabhängigen Glukose-Oxydation bei Fettzellen der Ratte ein Wert von $6 \times 10^{-11}\text{M}$ (CUATRECASAS, 1971a). Der entsprechende Wert für den insulinstimulierten Einbau von Glukose in Lipide liegt bei $5 \times 10^{-11}\text{M}$ (GLIEMANN, 1967). Demnach würde man einen Insulinrezeptor mit einer Dissoziationskonstanten in dieser Größenordnung erwarten. Eine Dissoziationskonstante von 10^{-11}M ermittelte CUATRECASAS (1971a) aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Rück- und Hinreaktion ($k_{-1}/k_{+1} = K_d$). Somit sollte es einen Rezeptor mit einer noch höheren Affinität für Insulin geben, als er bisher mit der Methode nach SCATCHARD (1949) ermittelt werden konnte. Unter den vorliegenden Versuchsbedingungen

wäre das aus technischen Gründen nicht möglich gewesen, da die Bestimmung dieser Dissoziationskonstanten sich nach der spezifischen Aktivität und der niedrigsten sinnvoll anwendbaren Hormonkonzentration richtet. Diese lag etwa bei $7 \times 10^{-10} \text{ M}$. Eine Erhöhung der spezifischen Aktivität durch Einführung von zusätzlichen ^{125}J -Atomen ginge mit einer zu hohen Einschränkung der biologischen Aktivität des Insulins einher. Durch Einführung mehrerer ^3H -Atome ließen sich wahrscheinlich ohne Verlust an biologischer Wirkung ausreichend hohe spezifische Aktivitäten am Insulinmolekül erreichen um eine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-11} M zu bestimmen. So bleibt es offen, ob die Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-9} M oder eine Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten von 10^{-11} M für die physiologischen Effekte des Insulins verantwortlich ist.

An den im Vergleich zu Fettzellen leicht zugänglichen Lymphozyten aus dem peripheren Blut oder aus Zellkulturen sind Insulinrezeptoren von verschiedenen Autoren nachgewiesen worden (KRUG et al., 1972; ARCHER et al., 1973a; GAVIN et al., 1973; OLEFSKY und REAVEN, 1974a). Auch Granulozyten und Erythrozyten weisen Insulinrezeptoren auf (GAVIN et al., 1972). Hier ergibt sich eine Möglichkeit, ohne großen technischen Aufwand Veränderungen der Insulinrezeptoren während eines Versuches zu verfolgen. Durch mehrmalige Blutabnahmen an demselben Individuum lassen sich Vorwerte und mehrere Behandlungswerte ermitteln.

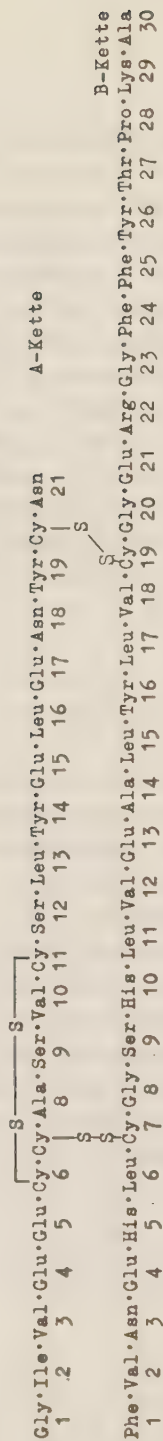
In der vorliegenden Arbeit wurde in einer Zellsus-

pension, die zu 80 % aus Humanlymphozyten bestand, Insulinrezeptoren nachgewiesen. Sie wurden auch an Lymphozyten vom Hund und vom Kaninchen gefunden. Die Bindung unterlag erheblichen Schwankungen innerhalb eines Tierkollektivs. Der Grund könnte darin liegen, daß außer den Lymphozyten die übrigen Zelltypen in der Suspension in unterschiedlichen Mengenverhältnissen vorlagen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die während der Durchführung dieser Arbeit veröffentlichten Ergebnisse von SCHWARZ et al. (1975). Nach diesen Autoren besitzen unter den Leukozyten nicht die Lymphozyten sondern vielmehr die Monozyten Insulinrezeptoren. Die Auswahl der geeigneten Zellen zur Messung von Insulinbindungsstellen muß somit neu überprüft werden.

4.2 Charakterisierung einiger neuer Insulinderivate

Zur Untersuchung der Frage nach Struktur - Wirkungsbeziehungen am Insulinmolekül eignen sich chemisch oder enzymatisch abgewandelte Insulinverbindungen. Modifikationen lassen sich besonders gut an den C- und N-terminalen Enden durchführen. Außerdem lassen sich einzelne Aminosäuren an den Kettenenden hydrolysieren oder Disulfidbrücken aufspalten. Veränderungen durch intra- oder intermolekulare Vernetzung des Insulinmoleküls eröffnen weitere Möglichkeiten zur Aufklärung der Funktion bestimmter Bereiche am Insulinmolekül. In Abb. 15 sind die Primärstruktur des Insulins und die Modifikationen der in der vorliegenden Arbeit geprüften Derivate schematisch dargestellt.

Primärstruktur des Insulins:



Derivat Nr.	...Glu Ala HCys Ala Ser...	Verkürzung in der A-Kette
4	5 6 7 8-11 12	
	Substituiert in Position	Substituent
1	A1 und B1	Carbamoyl- $\text{H}_2\text{N}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{R}$
3	- " -	Acetyl- $\text{H}_3\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{R}$
2	- " -	Hydroxyl- $\text{OH}-\text{R}$

Schematische Darstellung der Primärstruktur des Insulins (Rind) und einiger Insulinderivate

Die Einführung von einer oder mehreren Carbamoylgruppen ergibt in der Blutzuckersenkung beim Kaninchen keine Veränderungen in der Aktivität des Insulins (LINDSAY et al., 1972). Bei der Ratte erwiesen sich Dicarbamoyl- und Dihydroxyinsulin in den hier durchgeführten Untersuchungen ebenfalls als genauso wirksam wie natives Insulin. Ein ähnliches Ergebnis liegt aus Untersuchungen in vivo bei der Ratte und der Maus über Diacetylinsulin vor (LINDSAY und SHALL, 1971; GAMMELTOFT und GLIEMANN, zit. nach BRANDENBURG et al., 1972b). Diese drei Verbindungen zeigten in vitro eher eine herabgesetzte Wirkung gegenüber Insulin. Das deutet auf einen verschlechterten Abbau dieser Derivate im Organismus hin. Im allgemeinen wird angenommen, daß der enzymatische Abbau des Insulins in vivo hauptsächlich durch Spaltung der interchenaren Disulfidbrücken erfolgt (ENSINCK und WILLIAMS, 1972). Da es nicht zu erwarten ist, daß die reduktive Spaltung durch die aminoterminal Substitution beeinflußt wird, sprechen diese Ergebnisse für eine größere Beteiligung auch von Aminopeptidasen am Insulinabbau.

Veränderungen am aminoterminalen Ende der A-Kette, sei es durch Abspaltung der endständigen Aminogruppe oder der ganzen Aminosäure, durch Einführung verschiedener Substituenten oder durch Ersatz des Gly^{A1} durch Alanin, gehen mit einer Einbuße der Affinität zum Rezeptor, der Bindung an Antikörper und der biologischen Wirkung in vivo und in vitro einher. Ähnliche Veränderungen am aminoterminalen Ende der B-Kette läßt die Insulinwirkung nicht im selben Maße abfallen, obwohl auch dadurch Aktivitätsverminderungen verzeichnet wurden (GLIEMANN und GAMMELTOFT, 1974;

BLUNDELL et al., 1972; KERP et al., 1974; GEIGER et al., 1975; PULLEN et al., 1976). In Tabelle 14 sind die Werte für die Wirksamkeit verschiedener Acetylsubstituierter Insulinderivate mehrerer Autoren zusammengestellt. Je mehr Acetylgruppen eingeführt werden, um so mehr nimmt die Aktivität ab. Werden Monoacetylintuline miteinander verglichen, so ergibt sich auch hier, daß die Acetylierung an A1 größere Auswirkungen auf die Aktivität hat als eine Acetylierung an B1. Im ganzen zeigt sich aber, daß die Einführung von Acetylgruppen außer an A1 auch an B1 und an B29 mit einer Herabsetzung der Wirksamkeit des Insulins verbunden ist. Die beobachtete Aktivitätsverminderung in der Bindung am Fettzellrezeptor, an Antikörper und in der Glukose-Oxydation im acetylierten Derivat Nr. 3 ist somit wahrscheinlich auf die Einführung von Acetylgruppen an beiden N-terminalen Enden zurückzuführen.

Im Derivat Nr. 4 ist die A-Kette so verkürzt, daß die intrachenare Disulfidbrücke fehlt. Bei der Synthese war beabsichtigt mit dieser Veränderung in der Struktur die räumliche Anordnung des Gesamtmoleküls weitgehend intakt zu lassen. Das im Derivat fehlende Stück der A-Kette liegt im nativen Insulin an der Oberfläche des Moleküls. Da die Wirksamkeit des Derivats in allen durchgeführten Tests auf wenige Prozente des Kontrollwertes abfiel, kann geschlossen werden, daß der Abschnitt A5 - A12 zur Erhaltung der vollen biologischen Aktivität essentiell ist.

Im Gegensatz zu den übrigen Insulinderivaten leitet sich das Derivat Nr. 4 vom Schweineinsulin ab. Schweine- und Rinderinsulin unterscheiden sich in den Positionen

Tabelle 14

Zusammenstellung der biologischen Aktivität in vivo und in vitro, der Bindung am Insulinrezeptor und an Antikörper verschiedener acetylierter Insulinderivate

Acetylierte Aminosäuren im Insulinmolekül	Aktivität in verschiedenen Testsystemen relativ zum Rinderinsulin (100 %)					Literatur
	Mäusekrampf-test	Blut-zucker-senkung	Glukose-Oxyda-tion	Bindung am Re-zeptor	Bindung an Anti-körper	
Gly ^{A1}	100	100	40 35-40	25	17,3 47	LINDSAY und SHALL, 1971 ZAHN et al., 1972 GLIEMANN und GAMMELTOFT, 1974
Phe ^{B1}	96		75		<10	LINDSAY und SHALL, 1971 GATTNER**)
Gly ^{A1} , Phe ^{B1}	87	100	32 7*)	10	6,2 22	LINDSAY und SHALL, 1971 GLIEMANN und GAMMELTOFT***) eigene Untersuchungen
Gly ^{A1} , Lys ^{B29}		100-50	15-29 26-32	25 23	23	BRANDENBURG et al., 1972a FREYCHET et al., 1974 GLIEMANN und GAMMELTOFT, 1974
Phe ^{B1} , Lys ^{B29}		100	85		30	ZAHN et al., 1972
Gly ^{A1} , Phe ^{B1} , Lys ^{B29}	93	100-20	16-31	8	2,5 4-8	LINDSAY und SHALL, 1971 BRANDENBURG et al., 1972a FREYCHET et al., 1974

*) gemessen am Fettgewebe statt an Fettzellen

) zit. nach GLIEMANN und GAMMELTOFT, 1974; *) zit. nach BRANDENBURG et al., 1972b

A8 und A10 (s. LÜBKE et al., 1975). Bezüglich der Affinität zum Rezeptor verhalten sich die Insuline gleich (FREYCHET et al., 1971b). So kann der mit dem Derivat Nr. 4 erhaltene Effekt allein auf die Verkürzung in der A-Kette zurückgeführt werden.

Katzeninsulin zeigte eine Bindungsaktivität, die mit der des Rinderinsulins vergleichbar ist. Auch in der Glukose-Oxydation konnte kein signifikanter Unterschied zum Rinderinsulin festgestellt werden. Im allgemeinen ergibt ein Vergleich zwischen der Bindung am Insulinrezeptor und der biologischen Wirkung in vitro auch bei artfremden Insulinen eine enge Korrelation. Mißt man die Bindungsaffinität und die biologische Aktivität an der Ratte, ist Meerschweincheninsulin weniger wirksam als Schweine- oder Rinderinsulin. Fischinsulin nimmt eine Zwischenstellung zwischen Meerschweinchen- und Rinderinsulin ein (FREYCHET et al., 1971b). Von den Insulinen des Huhns und des Truthahns wird dagegen berichtet, daß sie aktiver sind als das Rinderinsulin (GAMMELTOFT und GLIEMANN, 1974; SIMON et al., 1974).

4.3 Insulinrezeptoren bei einigen Formen der Insulinresistenz

Bei Mäusen mit genetisch bedingter Fettsucht vom Stamm C 57BL/6 (homozygote Träger des Merkmals ob) und vom Stamm "New Zealand Obese" (Abk. NZO) wird eine Reduktion der Zahl an Insulinrezeptoren als Ursache für die Insulinresistenz angesehen (FREYCHET et al., 1972; KAHN et al., 1972; 1973; BAXTER et al., 1973; SOLL et al., 1974; FORGUE und FREYCHET, 1975).

Auch bei einer durch Goldthioglukose experimentell erzeugten Fettsucht bei der Maus konnte eine Abnahme in der Zahl der Insulinbindungsstellen an Lebermembranen festgestellt werden (SOLL et al., 1975). Allerdings sind die Befunde zur Insulinempfindlichkeit dieser Form der Adipositas sehr widersprüchlich (MAYER und ZIGHERA, 1954; CHRISTOPHE et al., 1961; STAUFFACHER und RENOLD, 1969; MATSUO und SHINO, 1972). Beim Menschen ist die Insulinresistenz bei einer Fettsucht nach Untersuchungen von ARCHER et al. (1973a, b) an peripheren Lymphozyten ebenfalls mit einer Herabsetzung der Insulinbindung verbunden. MARINETTI et al. (1972) erhielten ähnliche Ergebnisse an Fettzellmembranen adipöser Patienten.

Übereinstimmend mit den eigenen Untersuchungen ergab sich aus Scatchard-Analysen, daß sich die Dissoziationskonstante der Bindungsstelle mit hoher Affinität bei der Fettsucht nicht ändert. Nach Untersuchungen von SOLL und KAHN (1975) verhalten sich die Rezeptoren der ob/ob-Mäuse bezüglich ihrer physikalischen Eigenschaften wie z.B. der Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Zeit und der Temperatur sowie der Spezifität und Reversibilität, ähnlich wie die von den Kontrolltieren. Die Abnahme der Bindung ist offenbar nicht auf eine verringerte Affinität sondern auf eine niedrige Zahl an Bindungsstellen zurückzuführen.

AMATRUDA et al. (1975) untersuchten die Insulinbindung an Fettzellen von normalen und fettsüchtigen Patienten. Die Fettzellen der adipösen Patienten waren größer als die der Normalgewichtigen. Wenn die Bindung in den beiden Gruppen auf die DNS be-

zogen wurde, zeigte sich kein Unterschied. Im Gegensatz dazu ergaben die hier durchgeführten Versuche, daß bei der ob/ob-Maus die spezifische Insulinbindung und damit die Zahl der Rezeptoren, auf die ganze Zelle bezogen, geringer ist als bei den normalgewichtigen Kontrollen.

Eine Insulinresistenz kann außer bei der Fettsucht auch unter Gestageneinwirkung auftreten. Bei der Ratte konnten SCHILLINGER et al. (1974) mit Clomegestonacetat eine verschlechterte Glukosetoleranz feststellen. Die Insulinresistenz manifestierte sich auch in den eigenen Untersuchungen in einem Insulinbelastungstest. Exogen zugeführtes Insulin war bei den behandelten Ratten weniger effektiv in seiner Blutzucker-senkenden Wirkung als bei den Kontrollen. Durch diesen Versuch konnte ausgeschlossen werden, daß die durch Gestagen induzierte herabgesetzte Insulinwirkung auf einen erhöhten Abbau des Insulins zurückzuführen ist.

In den Versuchen von SCHILLINGER et al. war die basale Insulinausschüttung nach Behandlung mit Clomegestonacetat praktisch unverändert, nach Verabreichung von Glukose gegenüber den Kontrollen deutlich erhöht. Auch in den hier durchgeführten Versuchen bewirkte das Gestagen eine Erhöhung der Insulinspiegel gefütterter Tiere. Das deutet darauf hin, daß Clomegestonacetat ähnlich wie das Progesteron durch eine gesteigerte Insulinsekretion aus dem Pankreas, erhöhte Insulinspiegel im Serum hervorruft. COSTRINI et al. (1969) und HAGER et al. (1972) fanden, daß die durch Glukose stimulierte Insulinabgabe aus den Langerhans-Inseln in vitro bei progesteronbehandelten Ratten erhöht war. Auch bei schwangeren Ratten wurde aus dem

Pankreas in vitro nach Glukosestimulierung mehr Insulin ausgeschüttet als bei den Vergleichstieren (MALAISSE et al., 1969; GREEN et al., 1975). Das Pankreasgewebe schwangerer Ratten zeigte eine erhöhte Zahl an β -Zellen, die β -Zellen waren größer und enthielten mehr Granulae als die der normalen Tiere (van ASSCHE, 1972; AERTS und van ASSCHE, 1975). Inwieweit diese die Insulinsekretion fördernde Wirkungen direkt auf Progesteron zusuckzuführen sind, erscheint besonders bei der Schwangerschaft fraglich. Untersuchungen von BECK (1967) und KALKHOFF et al. (1969) deuten darauf hin, daß auch andere Schwangerschaftshormone wie Östriol und HPL dafür verantwortlich sein könnten.

Die Behandlung von Ratten mit Clomegestonacetat ergab an isolierten Fettzellen eine herabgesetzte spezifische Bindung. Wie bei der Adipositas konnte die niedrige Bindung nicht auf eine verminderte Affinität der Bindungsstellen zurückgeführt werden, denn die Dissoziationskonstante war bei den behandelten und Kontrolltieren annähernd gleich. Dagegen war die Zahl der Rezeptoren nach der Behandlung deutlich vermindert. Eine vergleichbare Abnahme an Insulinrezeptoren wurden beim Altersdiabetes beim Menschen an peripheren Lymphozyten (OLEFSKY und REAVEN, 1974b) und an Lebermembranen der insulinresistenten KK-Maus gefunden (KERN et al., 1975). Nach OLEFSKY und REAVEN (1975a) haben auch ältere schwerere Ratten weniger Insulinbindungsstellen pro Fettzelle als jüngere Tiere. Gemessen an der insulinstimulierten Umsetzung von Glukose in Lipide zeigten HANSEN et al. (1974), daß die Insulinempfindlichkeit der Fettzellen mit zunehmendem Alter bei der Ratte abnimmt.

Nach Untersuchungen von CLARKE et al. (1975) konnte die Insulinunterempfindlichkeit der Fettzellen älterer Ratten eindeutig auf die Insulinrezeptoren zurückgeführt werden. Die Implantation eines Hypophysentumors, der erhöhte Mengen Wachstumshormon (STH), Adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und Prolactin sezerniert und u.a. erhöhte Spiegel von Insulin und Glukocorticoiden im Serum bewirkt, erzeugt ebenfalls eine Insulinresistenz bei der Ratte. Auch in diesem Fall konnte eine Abnahme der Zahl an Insulinrezeptoren verzeichnet werden (GOLDFINE et al., 1973). So war es naheliegend die Insulinresistenz auch nach Behandlung mit Clomegestonacetat auf die herabgesetzte Zahl der Bindungsstellen zurückzuführen. Zunächst wurden die erhöhten Insulinspiegel im Serum als Ursache für die reduzierte Bindung vermutet.

Die Bindungsstellen könnten bei der Rezeptormessung noch mit Insulin beladen sein. Ist ein Rezeptor mit endogenem Insulin besetzt, so kann dies zu einer scheinbaren Herabsetzung der spezifischen Bindung führen. Wenn die Bindungsstellen von behandelten und Kontrollratten in unterschiedlichem Maße mit Insulin beladen waren, könnte dies auch eine Reduktion der spezifischen Bindung durch Änderung der Affinität im Sinne einer negativen Kooperativität bewirkt haben. Gegen eine Beeinflussung der Bindung durch endogenes Insulin spricht die rasche Dissoziation von Insulin aus der Rezeptorbindung. In Versuchen mit Insulinrezeptoren an Lymphozyten konnten ROTH et al. (1975) nach Vorinkubation der Zellen mit Insulin eine dadurch entstandene Herabsetzung der Bindung ausschließen. Besonders die eigenen Versuche mit Alt-Insulin^(R) sprechen gegen einen unmittelbaren Einfluß des Serum-

insulins auf die Bindung. Die Insulinspiegel der behandelten Tiere lagen zum Zeitpunkt der Zellisolierung noch sehr hoch. Dennoch konnte in der spezifischen Bindung kein Unterschied zu den Kontrolltieren festgestellt werden.

Es gibt mehrere Hinweise dafür, daß Insulin selbst die Konzentration seines eigenen Rezeptors reguliert. In einem in vitro Versuch von GAVIN et al. (1974) zeigten Lymphozyten aus Zellkulturen nach 16stündiger Inkubation bei einer Konzentration von 10^{-8} M Insulin eine Herabsetzung der spezifischen Bindung. Der Effekt kam bei höheren Insulinkonzentrationen schneller und deutlicher zum Ausdruck, konnte aber selbst bei physiologischen Insulinkonzentrationen (10^{-9} M) demonstriert werden. Nachdem die Zellen gewaschen wurden und in ein Insulin-freies Medium gebracht wurden, konnte die ursprüngliche Bindungsfähigkeit der Zellen wieder erreicht werden. In ergänzenden Untersuchungen wurde gezeigt, daß sowohl die insulingesteuerte Abnahme als auch die Zunahme an Rezeptoren durch das die Proteinsynthese hemmende Cycloheximid beeinträchtigt wurde (ROTH et al., 1975). HUANG und CUATRECASAS (1975) gelang es auch an Fettzellen eine Herabsetzung der spezifischen Bindung nach vierstündiger Vorinkubation mit Insulin zu demonstrieren. Die Regulierung der Rezeptormenge ist somit als ein dynamischer Prozeß anzusehen, der durch das Insulin kontrolliert werden kann.

Ausgehend von diesen Befunden wurde beabsichtigt, eine Herabsetzung der Insulinbindung direkt durch Verabreichung von exogenem Insulin in vivo zu bewirken. Die Tatsache, daß durch die Behandlung mit

Alt-Insulin^(R) keine Veränderungen in den Insulinrezeptoren zu erreichen waren, kann auf die kurze Halbwertszeit des Insulins im Organismus zurückzuführen sein. Es wird vermutet, daß auch Depot-Insulin^(R) zu rasch abgebaut wurde, um eine deutliche Reduzierung in der Insulinbindung zu verursachen. Wahrscheinlich müßte das Insulin in noch kürzeren Abständen oder kontinuierlich verabreicht werden.

In vivo kann umgekehrt durch Senkung der Insulinspiegel im Serum eine Erhöhung der Zahl an Bindungsstellen und eine verbesserte Insulinempfindlichkeit am Tier induziert werden. So bewirken durch Alloxan oder Oxytetracyclin herabgesetzte Insulinspiegel bei der ob/ob-Maus eine Zunahme der Insulinbindung und eine Abnahme der Insulinresistenz (BEGIN-HEICK et al., 1974; FORGUE und FREYCHET, 1975). BAXTER et al. (1973) gelang es an fettsüchtigen NZO-Mäusen nach Implantation von Pankreasgewebe normalgewichtiger Tiere ebenfalls die Insulinspiegel und die Insulinbindungsstellen von Leber- und Fettzellmembranen zu normalisieren. Bei fettsüchtigen Patienten konnte eine normale Sensibilität gegenüber Insulin an Lymphozyten aus dem peripheren Blut nach Kalorierestriktion erreicht werden (ARCHER et al., 1975). Weiter ist festgestellt worden, daß bei sehr niedrigen Insulinkonzentrationen wie nach Hypophysektomie oder nach Erzeugung eines experimentellen Diabetes mit Streptozotocin die Zahl der Insulinbindungsstellen zunimmt (ROTH et al., 1974; GOLDFINE, 1975). Allerdings konnte POSNER et al. (1974b) und vann BENNETT und CUATRECASAS (1972) in ihren Untersuchungen eine derartige Auswirkung einer Hypophysektomie oder eines Streptozotocin-Diabetes nicht bestätigen.

Neben den Bindungsstellen für Insulin scheint auch die Steuerung der Rezeptorkonzentration anderer Hormone einer hormonellen Kontrolle zu unterliegen. Von STH-Rezeptoren an Lymphozyten in vitro wurde berichtet, daß ihre Zahl ähnlich wie die der Insulinbindungsstellen durch steigende Mengen STH verringert wird. In der Abwesenheit des Hormons wird die ursprüngliche Rezeptorkonzentration wieder hergestellt (LESNIAK et al., 1974). Im Gegensatz zu Insulin und STH erhöhen Injektionen von Östrogenen die Menge an Östrogenrezeptoren im Uterus der Ratte (GORSKI et al., 1972). Die Verabreichung von Prolactin läßt die Konzentration an Prolactinrezeptoren an Lebermembranen männlicher Ratten ansteigen (POSNER et al., 1975).

Die Menge an Rezeptoren kann offensichtlich außer durch das eigene Hormon auch durch andere Hormone gesteuert werden. Nach Untersuchungen von POSNER et al. (1974b) und MILGROM et al. (1973) können Östrogene den Gehalt an STH-, Prolactin- und Progesteronrezeptoren erhöhen. Von den ACTH-Rezeptoren an Fettzellmembranen ist die Vermutung geäußert worden, daß ihre Konzentration durch Glukocorticoide kontrolliert wird (HECHTER, 1970). OLEFSKY et al. (1975b) fanden eine Verringerung der Menge an Insulinrezeptoren nach Behandlung mit Corticoiden. Untersuchungen an Plazentamembranen des Menschen ergaben, daß die Menge von Insulinrezeptoren in verschiedenen Stadien der Schwangerschaft unterschiedlich ist (POSNER, 1974a). Aus den Untersuchungen dieser Autoren geht jedoch nicht eindeutig hervor, ob die herabgesetzte Insulinbindung auf die verabreichten Corticoide einerseits bzw. auf die Schwangerschaftshormone andererseits zurückzuführen ist. Diese Effekte können auch

auf die gleichzeitig erhöhten Insulinspiegel zurückgeführt werden. Die in den eigenen Untersuchungen beobachtete unerwartete, wenn auch nur schwache Reduzierung der Insulinbindung nach Behandlung mit Cyproteronacetat, war nicht mit einer Erhöhung der Insulinspiegel verbunden. Dieses Ergebnis unterstützt die Annahme, daß nicht nur Insulin allein, sondern unabhängig davon auch andere Hormone die Zahl der Insulinrezeptoren regulieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurden Insulinrezeptoren untersucht.

Die methodischen Voraussetzungen zum Nachweis von Insulinrezeptoren an Fettzellen und Lymphozyten wurden ausgearbeitet. An Fettzellen der Ratte, Maus Katze, des Hundes und des Affen sowie an Lymphozyten vom Menschen, Hund und Kaninchen wurden Insulinrezeptoren bestimmt. Die Dissoziationskonstante K_d für die Insulinrezeptoren an Fettzellen von Ratte, Maus und Hund liegt im Bereich von $5 \times 10^{-9} M$. Außerdem wurde eine zweite Bindungsstelle mit einer Dissoziationskonstanten von etwa $10^{-7} M$ gefunden. Die Methodik wurde ausführlich diskutiert. Auf die biologische Relevanz der beiden Rezeptoren wurde eingegangen.

Der Rezeptortest wurde zur Prüfung der Bindungseigenschaften einiger neuer Insulinderivate sowie des Katzeninsulins eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit der Bindung an Antikörper, der biologischen Wirkung in vitro durch Messung der insulinstimulierten Glukose-Oxydation am Fettgewebe, und in vivo durch Messung der Blutzucker-senkenden Wirkung dieser Verbindungen verglichen. Die Einführung von Carbamoyl- oder Hydroxylgruppen in den Positionen Gly^{A1} und Phe^{B1} des Insulins bewirkte keine Abnahme in der Rezeptorbindung, dagegen eine herabgesetzte biologische Wirkung in vitro. Die Wirksamkeit in vivo blieb unverändert. Die Acetylierung an A1 und B1 ließ die Bindung am Rezeptor und die insulinstimulierte Glukose-Oxydation absinken. Alle an A1 und B1 substituierten Derivate hatten eine niedrige Bindung an Antikörper.

Eine Verkürzung in der A-Kette führte zu einer deutlichen Aktivitätsverminderung des Insulins in allen geprüften Parametern. Mit Katzeninsulin wurde keine Unterschiede zum Rinderinsulinstandard gefunden. Die Ergebnisse wurden zusammen mit entsprechenden Befunden aus der Literatur diskutiert.

Weiter wurde der Zusammenhang zwischen Insulinrezeptoren und Insulinresistenz untersucht. An Fettzellen der insulinresistenten Maus mit genetisch bedingter Fettsucht (ob/ob) wurde eine geringfügige Abnahme der Zahl an Insulinrezeptoren pro Fettzelle gefunden. Das Auftreten einer Insulinresistenz wurde nach Behandlung mit dem synthetischen Gestagen Clomegestonacetat in einer Dosis von 2,5 mg/kg bestätigt. Die Menge der Insulinrezeptoren wurde nach Behandlung mit 2,5 und 8 mg/kg Clomegestonacetat gemessen. Eine Abnahme in der Zahl der Insulinrezeptoren trat bei der höheren Dosis auf. Mit dem strukturell verwandten Gestagen Cyproteronacetat konnte in einer Dosierung von 2 mg/kg im Glukosetoleranztest eine leichte Überempfindlichkeit gegenüber Insulin festgestellt werden. Trotzdem war die Zahl der Insulinrezeptoren bei derselben Dosis im Vergleich zu den Kontrollen etwas reduziert. Zur Klärung der Frage ob Insulin selbst an der Regulation der Insulinrezeptormenge beteiligt ist, wurden Tiere direkt mit Alt-Insulin^(R) und Depot-Insulin^(R) behandelt. Es wurden keine signifikante Unterschiede zu den Kontrollen erzielt. Für die Ausbildung einer Insulinresistenz können neben Insulin offenbar noch andere Faktoren verantwortlich sein.

- AERTS, L. und F. A. van ASSCHE: Ultrastructural changes of the endocrine pancreas in pregnant rats; *Diabetologia* 11, 285 - 289 (1975)
- AMATRUDA, J. M., J. N. LIVINGSTON und D. H. LOCKWOOD: Insulin receptor: role in the resistance of human obesity to insulin; *Science* 188, 264 - 266 (1975)
- ARCHER, J. A., P. GORDEN, J. R. GAVIN III, M. A. LESNIAK und J. ROTH: Insulin receptors in human circulating lymphocytes: application to the study of insulin resistance in man; *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36, 627 - 633 (1973a)
- ARCHER, J. A., P. GORDEN, C. R. KAHN, J. R. GAVIN III, D. M. NEVILLE Jr., M. M. MARTIN und J. ROTH: Insulin receptor deficiency states in man: two clinical forms; *J. Clin. Invest.* 52, p. 4a (1973b)
- ARCHER, J. A., P. GORDEN und J. ROTH: Defect in insulin binding to receptors in obese man, amelioration with calorie restriction; *J. Clin. Invest.* 55, 166 - 174 (1975)
- ARMSTRONG, K. J., M. W. NOALL und J. E. STOFFER: Dextran-linked insulin: a soluble high molecular derivative with biological activity in vivo and in vitro; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 47 354 - 360 (1972)
- ASSCHE van, F. A.: Histochemistry and quantitative histology of the endocrine pancreas in non-pregnant and pregnant rats; *Diabetologia* 8, p. 71 (1972)
- BASTENIE, P. A.: Endocrine disorders and diabetes; in: E. F. PFEIFFER (Hrsg.): *Handbuch des Diabetes mellitus*, Band II, J. F. Lehmanns Verlag, München, 1969, pp. 871 - 912
- BAXTER, D., R. J. GATES und N. R. LAZARUS: Insulin receptor of the New Zealand obese mouse (NZO): changes following the implantation of islets of Langerhans; *Excerpta Med. Int. Congr. Ser* 280 Abstr. Nr. 161 (1973)

- BECK, P. und W. H. DAUGHADAY: Human placental lactogen: studies of its acute metabolic effects and disposition in normal man; J. Clin. Invest. 46, 103 - 110 (1967)
- BECK, P.: Progestin enhancement of the plasma insulin response to glucose in Rhesus monkeys; Diabetes 18, 146 - 152 (1969)
- BEGIN-HEICK, N., M. BOURASSA und H. M. C. HEICK: The effect of oxytetracycline on insulin resistance in obese mice; Biochem. J. 142, 465 - 475 (1974)
- BENNETT vann, G. und P. CUATRECASAS: Insulin receptors of fat cells in insulin resistant metabolic states; Science 176, 805 - 806 (1972)
- BLATT, L. M. und K-H. KIM: Regulation of hepatic glycogen synthetase; stimulation of glycogen synthetase in an in vitro liver system by insulin bound to sepharose; J. Biol. Chem. 246, 4895 - 4898 (1971)
- BLUNDELL, T. L., G. G. DODSON, D. L. HODKIN, D. A. MERCOLA: Insulin: the structure in the crystal and its reflection in chemistry and biology; Adv. Prot. Chem. 26, 279 - 402 (1972)
- BÖYUM, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood; The Scand. J. of Lab. Inv. 21, Suppl. 94 - 100, pp. 77 - 88 (1967)
- BRANDENBURG, D., H-G. GATTNER und A. WOLLMER: Darstellung und Eigenschaften von Acetylderivaten des Rinderinsulins I; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 353, 599 - 617 (1972)
- BRANDENBURG, D., W. D. BUSSE, H-G. GATTNER, H. ZAHN, A. WOLLMER, J. GLIEMANN und W. PULS: Structure function studies with chemically modified insulins; in: H. HANSON und H-D. JAKUBKE (Hrsg.) Peptides, proceedings of the 21th European peptide symposium, Reinhardttsbrunn, DDR, September 1972, North-Holland, Amsterdam, pp. 24 - 30

- CARPENTER, F. H. und A. CHRAMBACH: On the amid content of insulin fractions isolated by partition column chromatography and counter-current distribution; J. Biol. Chem. 237, 404-408 (1962)
- CATT, K. J. und G. W. TREGGAR: Solid-phase radio-immunoassay in antibody-coated tubes; Science 158, 1570 - 1572 (1967)
- CERASI, E. und R. LUFT: Clinical diabetes and theories of pathogenesis; in: R.O. GREEP, E.B. ASTWOOD, D. F. STEINER, N. FREINKEL und S. R. GEIGER (Hrsg.): Handbook of physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. I, American Physiological Society, Washington D.C., 1972 pp. 627 - 640
- CHEN, R. F.: Removal of fatty acids from serum albumin by charcoal treatment; J. Biol. Chem. 242, 173 - 181 (1967)
- CHRAMBACH, A. und F. H. CARPENTER: Partition column chromatography of insulin: production and separation of transformation products; J. Biol. Chem. 235, 3478 - 3483 (1960)
- CHRISTOPHE, J., B. JEANRENAUD, J. MAYER und A. E. RENOLD: Metabolism in vitro of adipose tissue in obese-hyperglycemic and goldthiogluco- treated mice I. Metabolism of glucose; J. Biol. Chem. 236, 642 - 647 (1961)
- CLARKE, P. V., A. H. KISSEBAH, H. HOPE-GILL, N. VYDELINGUM, B. TULLOCH und T. R. FRASER: The role of calcium in insulin action IV. Mechanism of insulin resistance in adipose tissue of obese (ob/ob) mice and old Wistar rats; Eur. J. Clin. Invest. 5, 351 - 358 (1975)
- COSTRINI, N. V., M. JACOBSSON und R. K. KALKHOFF: Progesteron augmentation of plasma insulin responses and pancreatic islet secretion of insulin; Diabetes 18, Suppl. 1, p. 322 (1969)
- COSTRINI, N. V. und R. K. KALKHOFF: Relative effects of pregnancy, estradiol and progesterone on plasma insulin and pancreatic islet insulin secretion; J. Clin. Invest. 50, 992 - 999 (1971)

- CROFFORD, O. B. und A. E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue, rate-limiting steps and site of insulin action; J. Biol. Chem. 240, 14 - 21 (1965a)
- CROFFORD, O. B. und A. E. RENOLD: Glucose uptake by incubated rat epididymal adipose tissue, characteristics of the glucose transport system and action of insulin; J. Biol. Chem. 240, 3237 - 3244 (1965b)
- CUATRECASAS, P.: Interactions of insulin with the cell membrane: the primary action of insulin; Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 63, 450 - 457 (1969)
- CUATRECASAS, P.: Insulin-receptors interactions in adipose tissue cells: direct measurements and properties, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 68, 1264 - 1268 (1971a)
- CUATRECASAS, P.: Properties of the insulin receptor of isolated fat cell membranes; J. Biol. Chem. 246, 7265 - 7274 (1971b)
- CUATRECASAS, P.: Unmasking of insulin receptors in fat cells and fat cell membranes, perturbation of membrane lipids; J. Biol. Chem. 246, 6532 - 6542 (1971c)
- CUATRECASAS, P., B. DESBUQUOIS und F. KRUG: Insulin-receptor interactions in liver cell membranes: Biochem. Biophys. Res. Commun. 44, 333 - 339 (1971)
- CUATRECASAS, P.: Properties of the insulin receptor isolated from liver and fat cell membranes; J. Biol. Chem. 247, 1980 - 1991 (1972)
- CUATRECASAS, P.: Membrane Receptors; Ann. Rev. Biochem. 43, 169 - 214 (1974)
- CUATRECASAS, P.: Hormone receptors - their function in cell membranes and some problems related to methodology; Adv. in cyclic Nucleotide Res. 5, 79 - 104 (1975)
- CZECH, M. P. und J. N. FAIN: Insulin protection against fat cell receptor inactivation by trypsin; Endocrinology 87, 191 - 194 (1970)

- ENSINCK, J. W. und R. H. WILLIAMS: Hormonal and nonhormonal factors modifying man's response to insulin; in: R. O. GREEP, E. B. ASTWOOD, D. F. STEINER, N. FREINKEL und S. R. GEIGER (Hrsg.): Handbook of physiology, Section 7: Endocrinology, Vol. I, American Physiological Society, Washington D. C., 1972, pp. 665 - 684
- FAIN, J. N. und S. C. LOKEN: Response of trypsin-treated brown and white fat cells to hormones; J. Biol. Chem. 244, 3500 - 3506 (1969)
- FREYCHET, P., J. ROTH und D. M. NEVILLE Jr: Monoiodo-insulin: biological activity and binding to fat cells and liver membranes; Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 400 - 408 (1971a)
- FREYCHET, P., J. ROTH und D. M. NEVILLE Jr: Insulin receptors in the liver: specific binding of ^{125}J -Insulin to the plasma membrane and its relation to insulin bioactivity; Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 68, 1833 - 1837 (1971b)
- FREYCHET, P., C. R. KAHN, J. ROTH und D. M. NEVILLE Jr: Insulin interactions with liver plasma membranes: independence of binding to the hormone and its degradation; J. Biol. Chem. 247, 3953 - 3961 (1972a)
- FREYCHET, P., M. H. LAUDAT, P. LAUDAT, G. ROSSELIN, C. R. KAHN, P. GORDEN und J. ROTH: Impairment of insulin binding to the fat cell plasma membrane in the obese hyperglycemic mouse; FEBS Letters 25, 339 - 342 (1972b)
- FREYCHET, P., D. BRANDENBURG und A. WOLLMER: Receptor-binding assay of chemically modified insulin; Diabetologia 10, 1 - 5 (1974)
- FORGUE, E. und P. FREYCHET: Insulin receptor in the heart muscle: impairment of the insulin binding to the plasma membrane of the obese hyperglycemic mouse; Diabetes 23, Suppl. 1, 715 - 723 (1975)
- GAMMELTOFT, S. und J. GLIEMANN: Binding of ^{125}J -insulin to isolated fat cells; Acta physiol. scand. 84, 44a - 45a (1972)

- GAMMELTOFT, S. und J. GLIEMANN: Binding and degradation of ¹²⁵J-Insulin by isolated rat fat cells; Biochim. Biophys. Acta 320, 16 - 32 (1973)
- GAMMELTOFT, S. und J. GLIEMANN: The Binding of insulin from different animal species to rat fat cell receptors; Acta physiol. scand. 91, 7a - 8a (1974)
- GAMMELTOFT, S.: The significance of insulin receptors in isolated rat fat cells; Diabetologie 11, Abstr. Nr. 81 (1975)
- GAVIN III, J. R. , D. L. MANN, D. N. BUELL und J. ROTH: Preparation of solubilized insulin receptors from human lymphocytes; Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 870 - 876 (1972a)
- GAVIN III, J. R., J. ROTH und P. FREYCHET: Insulin receptors in human circulating cells and fibroblasts; Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 69, 747 - 751 (1972b)
- GAVIN III, J. R., P. GORDEN, J. ROTH, J. A. ARCHER und D. N. BUELL: Characteristics of the human lymphocyte insulin receptor; J. Biol. Chem. 248, 2202 - 2207 (1973)
- GAVIN III, J. R., J. ROTH, D. M. NEVILLE, P. DE MEYTS und D. N. BUELL: Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture; Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 71, 84 - 88 (1974)
- GARRATT, C. J., D. M. HARRISON und M. WICKS: The effect of iodination of particular tyrosine residues and the hormonal activity of insulin; Biochem. J. 126, 123 - 131 (1972)
- GEIGER, R., K. GEISEN, H.-D. STURUM und D. LANGER: [A1-D-Alanin] Insulin; Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 356, 1635 - 1649 (1975)
- GLIEMANN, J.: Assay of insulin-like activity by the isolated fat cell method I. Factors influencing the response to crystalline insulin; Diabetologia 3, 382 - 388 (1967)

- GLIEMANN, J., K. ØSTERLIND, J. VINTEN und S. GAMMELTOFT: A procedure for measurements of distribution spaces in isolated fat cells; *Biochim. Biophys. Acta* 286, 1 - 9 (1972)
- GLIEMANN, J. und S. GAMMELTOFT: The biological activity and the binding affinity of modified insulins determined on isolated rat fat cells; *Diabetologia* 10, 105 - 113 (1974)
- GLIEMANN, J., S. GAMMELTOFT und J. VINTEN: Time course of insulin-receptor binding and insulin-induced lipogenesis in isolated rat fat cells; *J. Biol. Chem.* 250, 3368 - 3374 (1975)
- GOLDFINE, I. D., C. R. KAHN, D. M. NEVILLE Jr, J. ROTH, M. M. GARRISON und R. W. BATES: Decreased binding of insulin to its receptors in rats with hormone induced insulin resistance; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 852 - 857 (1973)
- GOLDFINE, I. D.: Binding of insulin to thymocytes from suckling and hypophysectomized rats: two mechanisms regulating insulin sensitivity; *Endocrinology* 97, 948 - 954 (1975)
- GORSKI, J., M. SARFF und J. CLARK: The regulation of uterine concentration of estrogen binding protein; in: G. RASPE (Hrsg.): *Advances in the Biosciences* 7, Schering Workshop on steroid hormone receptors, Pergamon Press, Vieweg, Braunschweig, 1970, pp. 5 - 20
- GREEN, I. C. und K. W. TAYLOR: Metabolites and insulin release in pregnancy; *Diabetologia* 11, Abstr. Nr. 87 (1975)
- HAGER, D., R. H. GEORG, J. W. LEITNER und P. BECK: Insulin secretion and content in isolated rat pancreatic islets following treatment with gestational hormones; *Endocrinology* 91, 977 - 981 (1972)
- HALPERN, B. N. und F. PACAUD: Technique de prélèvement d'échantillons de sang chez les petits animaux de laboratoire par ponction de plexus ophtalmique; *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 145, 1465 - 1466 (1951)

- HAMLIN, J. L. und E. R. ARQUILLA: Monoiodoinsulin, preparation, purification and characterisation of a biologically active derivative substituted predominantly on tyrosine A14; J. Biol. Chem. 249, 21 - 25 (1974)
- HAOUR, F. und J. BERTRAND: Insulin receptors in the plasma membranes of human placenta; J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 334 - 337 (1974)
- HAMMOND, J. M., L. JARRETT, I. K. MARIZ und W. H. DAUGHADAY: Heterogeneity of insulin receptors on fat cell membranes; Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 1122 - 1128 (1972)
- HANSEN, F. M., J. H. NIELSEN und J. GLIEMANN: The influence of body weight and cell size on lipogenesis and lipolysis of isolated rat fat cells; Eur. J. Clin. Invest. 4, 411 - 418 (1974)
- HASSELBLATT, A.: Pharmakologische Ausschaltung vegetativer Störungen der Blutzuckerhomöostase; in: E. F. PFEIFFER (Hrsg.): Handbuch des Diabetes mellitus, Band I, J. F. Lehmanns Verlag, München, 1969, pp. 878 - 894
- HOLLENBERG, M. D. und P. CUATRECASAS: Insulin and epidermal growth factor; human fibroblast receptors related to deoxyribonucleic acid synthesis and amino acid uptake; J. Biol. Chem. 250, 3845 - 3853 (1975)
- HUANG, D. und P. CUATRECASAS: Insulin-induced reduction of membrane receptor concentrations in isolated fat cells and lymphocytes; J. Biol. Chem. 250, 8251 - 8259 (1975)
- JENSEN, E. V. und H. J. JACOBSON: Basic guides to the mechanisms of estrogen action; Rec. Progr. Horm. Res. 18, 387 - 414 (1962)
- JACOBSSON, B. und U. SMITH: Effect of cell size on lipolysis and antilipolytic action of insulin in human fat cells; J. Lipid. Res. 13, 651 - 656 (1972)
- JARRETT, L. und R. M. SMITH: Electron microscopic demonstration of insulin receptors on adipocyte plasma membranes utilizing a ferritin-insulin conjugate; J. Biol. Chem. 249, 7024 - 7031 (1974)

- JERUMS, G. und D. J. GALTON: Two types of insulin receptors mediating opposite effects of cyclic-AMP in fat cells of the rat; Horm. Metab. Res. 6, 242 - 243 (1974)
- KAHN, C. R., D. M. NEVILLE Jr, P. GORDEN, P. FREYCHET und J. ROTH: Insulin receptor defect in insulin resistance: studies in the obese-hyperglycemic mouse; Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 135 - 142 (1972)
- KAHN, C. R., D. M. NEVILLE Jr und J. ROTH: Insulin-receptor interaction in the obese-hyperglycemic mouse; a model of insulin resistance; J. Biol. Chem. 248, 244 - 250 (1973)
- KAHN, C. R., P. FREYCHET und J. ROTH: Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes; J. Biol. Chem. 249, 2249 - 2257 (1974)
- KALKHOFF, R. K., B. L. RICHARDSON und P. BECK: Relative effects of pregnancy, human placental lactogen and prednisolone on carbohydrate tolerance in normal and subclinical diabetic subjects; Diabetes 18, 153 - 163 (1969)
- KALKHOFF, R. K., M. JACOBSON und D. LEMPER: Progesterone, pregnancy and the augmented plasma insulin response; J. Clin. Endocrinol. Metab. 31, 24 - 28 (1970)
- KERN, P., J. PICARD, M. CARON und D. VERNISSIERE: Decreased binding of insulin to liver plasma membrane receptors in hereditary diabetic mice; Biochim. Biophys. Acta 389, 281 - 289 (1975)
- KERP, L., S. STEINHILBER, H. KASEMIR, J. HAN, H. R. HENRICKS und R. GEIGER: Changes in immunospecificity and biologic activity of bovine insulin due to subsequent removal of the amino acids B1, B2 and B3; Diabetes 23, 651 - 656 (1974)
- KIPNIS, D. M.: Regulation of glucose uptake by muscle: functional significance of permeability and phosphorylating activity; Ann. N. Y. Acad. Sci. 82, 354 - 365 (1959)

KONO, T. und F. T. BARHAM: Insulin-like effects of trypsin on fat cells, localisation of the metabolic steps and the cellular site affected by the enzyme; J. Biol. Chem. 246, 6204 - 6209 (1971a)

KONO, T. und F. T. BARHAM: The relationship between the insulin-binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin, studies with intact and trypsin-treated fat cells; J. Biol. Chem. 246, 6210 - 6216 (1971b)

KONO, T.: The insulin receptor of fat cells; in: E. FRITZ (Hrsg.): Insulin action, Academic Press, New York, London, 1972, pp. 171 - 203

KRUG, U., F. KRUG und P. CUATRECASAS: Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during in vitro transformation; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2604 - 2608 (1972)

LESNIAK, M. A., P. GORDEN, J. ROTH und J. R. GAVIN: Binding of ¹²⁵I-human growth hormone to specific receptors in human cultured lymphocytes; J. Biol. Chem. 249, 1661 - 1667 (1974)

LINDSAY, D. G. und S. SHALL: The acetylation of insulin; Biochem. J. 121, 737 - 745 (1971)

LINDSAY, D. G. O. LOGE, W. LOSERT und S. SHALL: Carbamyl- and methylthiocarbamylinsulins; Biochim. Biophys. Acta 263, 658 - 665 (1972)

LÜBKE, K., E. SCHRÖDER und G. KLOSS: Chemie und Biochemie der Aminosäuren, Peptide und Proteine, Band I, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1975

LÜBKE, K., E. SCHILLINGER und M. TÖPERT: Hormon-Rezeptoren; in Vorbereitung (1976)

MALAISSSE, W. J., F. MALAISSSE-LAGAE, C. PICARD und J. FLAMENT-DURAND: Effects of pregnancy and chorionic growth hormone upon insulin secretion; Endocrinology 84, 41 - 44 (1969)

- MARINETTI, G. V., L. SCHLATZ und K. REILLY:
Hormone - membrane interactions; in E. FRITZ
(Hrsg.): Insulin action, Academic Press,
New York, 1972, pp. 207 - 225
- MARSHALL, R. N., L. E. UNDERWOOD, S. J. VOINA,
D. B. FOUSHEE und J. J. van WYK: Characterisation
of the insulin and somatomedin-C receptors in
human placenta cell membranes; J. Clin.
Endocrinol. Metab. 39, 283 - 292 (1974)
- MARTINI, O. und J. HAHN: Messung von Insulin-
aktivität an isolierten Fettzellen; Hoppe-
Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1461 - 1476
(1967)
- MATSUO, T. und A. SHINO: Induction of diabetic
alterations by goldthioglucose-obesity in KK,
ICR and C57BL mice; Diabetologia 8, 391 - 397
(1972)
- MAYER, J. und Y. ZIGHERA: The multiple ethiology
of obesity: production of two types of obesity
in littermate mice; Science 119, 96 - 97 (1954)
- MELANI, F., J. LAWECKI, K. M. BARTELT und
E. F. PFEIFFER: Immunologisch messbares Insulin
(IMI) bei stoffwechselgesunden und adipösen
Diabetikern nach intravenöser Gabe von Glukose,
Tolbutamid und Glukagon; Diabetologia 3, 422 -
426 (1967)
- MERCK, E. (Hrsg.): Klinisches Labor, 11. Auflage der
Medizinisch-chemischen Untersuchungsmethoden,
Darmstadt, 1970
- MEYTS DE, P., J. ROTH, D. M. NEVILLE Jr,
J. R. GAVIN III und M. A. LESNIAK: Insulin
interactions with its receptors: experimental
evidence for negative cooperativity; Biochem.
Biophys. Res. Commun. 55, 154 - 161 (1973)
- MEYTS DE, P.: The negative cooperativity of insulin
receptors: a model for the regulation of hormone
recognition by target cells; in: R. F. BEERS Jr
und E. G. BASSETT (Hrsg.): Cell membrane
receptors for viruses, antigens and antibodies,
polypeptide hormones, and small molecules,
Raven Press, New York, 1976, pp. 17 - 32

- MILGROM, E., L. THI, M. ATGER und E-E.BAULIEU: Mechanisms regulating the concentration and the conformation of progesterone receptor(s) in the uterus; J. Biol. Chem. 248, 6366 - 6374 (1973)
- MONOD, J., J. WYMAN und J. P. CHANGEUX: On the nature of allosteric transitions: a plausible model; J. Mol. Biol. 12, 88 - 118 (1965)
- MORGAN, C. R. und A. LAZAROW: Immunoassay of insulin using an two-antibody system; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 110, 29 - 32 (1962)
- MORGAN, C. R. und LAZAROW: Immunoassay of insulin, two antibody system. Plasma insulin levels of normal, subdiabetic and diabetic rats; Diabetes 12, 115 (1963)
- MORGAN, C. R., R. L. SORENSON und A. LAZAROW: Further studies of an inhibitor of the two antibody system; Diabetes 13, 579 (1964)
- O'KEEFE, E. und P. CUATRECASAS: Insulin receptors in murine mammary cells: comparison in pregnant and nonpregnant animals; Biochim. Biophys. Acta 343, 64 - 77 (1974)
- OLEFSKY, J. und G. M. REAVEN: The human lymphocyte: a model for the study of insulin-receptor interaction; J. Clin. Endocrinol. Metab. 38, 554 - 560 (1974a)
- OLEFSKY, J. M. und G. M. REAVEN: Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetic subjects; J. Clin. Invest 54, 1323 - 1328 (1974b)
- OLEFSKY, J. M. und G. M. REAVEN: Effects of age and obesity on insulin binding to isolated adipocytes; Endocrinology 96, 1486 - 1498 (1975a)
- OLEFSKY, J. M., J. JOHNSON, F. LIU, Ph. JEN und G. M. REAVEN: The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes; Metabolism 24, 517 - 527 (1975b)
- PULLEN, R. A., D. G. LINDSAY, S. P. WOOD, I. J. TICKLE T. L. BLUNDELL, A. WOLLMER, G. KRAIL, H. ZAHN, D. BRANDENBURG, J. GLEIMANN und S. GAMMELTOFT: Receptor-binding region of insulin; Nature 259, 369 - 373 (1976)

- OLEFSKY, J., V. C. BACON und S. BAUR: Insulin receptors of skeletal muscle: specific insulin binding sites and demonstration of decreased numbers of sites in obese rats; *Metabolism* 25, 179 - 191 (1976)
- PARK, C. R., H. E. MORGAN, M. J. HENDERSON, D. M. REGEN, E. CADENAS und R. L. POST: The regulation of glucose uptake in muscle as studied in the perfused rat heart; *Rec. Progr. Horm. Res.* 17, 493 - 538 (1961)
- PITKIN, R. M., D. E. van ORDEN und W. A. REYNOLDS: Plasma insulin response and glucose tolerance in pregnant Rhesus monkeys; *Endocrinology* 86, 2 (1970)
- POSNER, B. I.: Insulin receptors in human and animal placental tissue; *Diabetes* 23, 209 - 217 (1974a)
- POSNER, B. I., P. A. KELLY, R. P. C. SHIN und H. G. FRIESEN: Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: tissue distribution, species variation and characterisation; *Endocrinology* 95, 521 - 531 (1974b)
- POSNER, B. I., P. A. KELLY und H. G. FRIESEN: Prolactin receptors in rat liver: possible induction by prolactin; *Science* 188, 57 - 59 (1975)
- POWELL, W. S., S. HAMMARSTRÖM und B. SAMUELSSON: Prostaglandin $F_{2\alpha}$ receptor in ovine corpora lutea; *Eur. J. Biochem.* 41, 103 - 107 (1974)
- RASPE, G. (Hrsg.): Advances in the biosciences 7, Schering Workshop on steroid hormone 'receptors', Berlin, December 7 - 9, 1970, Pergamon Press, Vieweg, Braunschweig, 1970
- RODBELL, M.: Metabolism of isolated fat cells I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis; *J. Biol. Chem.* 239, 375 - 380 (1964)
- RODBELL, M.: Metabolism of isolated fat cells II. The similar effects of phospholipase c (*Clostridium perfringens* α Toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism; *J. Biol. Chem.* 241, 130 - 139 (1966a)

RODBELL, M. und A. B. JONES: Metabolism of isolated fat cells III. The similar inhibitory action of phospholipase c (*Clostridium perfringens* α toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline; J. Biol. Chem. 241, 140 - 142 (1966b)

RODBELL, M.: Metabolism of isolated fat cells IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin; J. Biol. Chem. 241, 3909 - 3917 (1966c)

RODBELL, M.: Metabolism of isolated fat cells VI. The effects of insulin, lipolytic hormones, and theophylline on glucose transport and metabolism in "ghosts"; J. Biol. Chem. 242, 5751 - 5756 (1967)

ROSENTHAL, H. E.: A graphic method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system; Anal. Biochem. 20, 525 - 532 (1967)

ROTH, J.: Peptide hormone binding to receptors: a review of direct studies in vitro; Metab. (Clin. Exp.) 22, 1059 - 1073 (1973)

ROTH, J.: Target cell sensitivity to insulin: role of insulin receptors; Diabetes 23, Abstr. Nr. 67 (1974)

ROTH, J., C. R. KAHN, M. A. LESNIAK, P. GORDEN, P. DE MEYTS, K. MEGYESI, D. M. NEVILLE Jr, J. R. GAVIN III, A. H. SOLL, P. FREYCHET, I. D. GOLDFINE, R. S. BAR und J. A. ARCHER: Receptors for insulin, NSILA-s, and growth hormone: applications to disease states in man; Rec. Progr. Horm. Res. 31, 95 - 139 (1975)

RUBENSTEIN, A. H., F. MELANI und D. F. STEINER: Circulating proinsulin: immunology, measurement, and biological activity; in: R. O. GREEP, E. B. ASTWOOD, D. F. STEINER, N. FREINKEL und S. R. GEIGER (Hrsg.) Hand-book of physiology, Section 7; Endocrinology, Vol. I, American Physiological Society, Washington D. C., 1972, pp. 515 - 528

- SACHS, L. Statistische Auswertungsmethoden; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1972
- SALANS, L. B., J. K. WISE und N. H. HANOVER: Progestin induced changes in fat cell size and insulin sensitivity of adipose tissue; Clin. Res. 18, Abstr. Nr. 540 (1970)
- SCATCHARD, G., The attractions of proteins for small molecules and ions; Ann. N.Y. Acad. Sci. 51, 660 (1949)
- SCHILLINGER, E., Ch. GERLOFF, E. GERHARDS und P. GÜNZEL: Glucose tolerance and serum insulin in rats and insulin sensitivity of rat adipose cells following treatment with the progestogen clomegestonacetat; Acta endocr. 75, 305 - 313 (1974)
- SCHWARTZ, R. H., A. R. BIANCO, B. S. HUNDWERGER und C. R. KAHN: Demonstration that monocytes rather than lymphocytes are the insulin-binding cells in preparations in human peripheral blood. Mononuclear leucocytes: implications for studies of insulin resistant states in man; Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 474 - 478 (1975)
- SCRIBA, P. C. und K. von WERDER: Wirkungen und Nebenwirkungen der Glukocorticoide; Der Internist 13, 261 - 269 (1972)
- SELTZER, H. S., E. W. ALLEN, A. L. HERROR und M. T. BRENNAN: Insulin secretion in response to glycemic stimulus: relation of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes mellitus; J. Clin. Invest. 46, 323 - 335 (1967)
- SISS, E. A., M. L. NESTORESCU und O. H. WIELAND: Localization of insulin on fat cell ghosts by ferritin labelled insulin antibodies; Diabetologia 10, 439 - 447 (1974)
- SIMON, J., P. FREYCHET und G. ROSSELIN: Chicken insulin: radioimmunological characterisation and enhanced activity in rat fat cells and liver plasma membranes; Endocrinology 95, 1439 - 1449 (1974)

- SIMS, E. A. H., E. DANFORTH, S. HORTON, G. A. BRAY, J. A. GLENNON und L. B. SALANS: Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man; Rec. Progr. Horm. Res. 29, 457 - 496 (1973)
- SOLL, A. H., I. D. GOLDFINE, J. ROTH, C. R. KAHN und D. M. NEVILLE Jr: Thymic lymphocytes in obese obese (ob/ob) mice, a mirror of the insulin receptor defect in liver and fat; J. Biol. Chem. 249, 4127 - 4131 (1974)
- SOLL, A. H., C. R. KAHN, D. M. NEVILLE Jr und J. ROTH: Insulin receptor deficiency in genetic and acquired obesity; J. Clin. Invest. 56, 769 - 780 (1975)
- SOLL, A. H. und C. R. KAHN: Insulin binding to liver plasma membranes in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse, demonstration of a decreased number of functionally normal receptors; J. Biol. Chem. 250, 4702 - 4707 (1975)
- SPELLACY, W. N., W. C. BUHI und S. A. BIRK: Norgestrel and carbohydrate metabolism: glucose, insulin and triglyceride changes during six months time of use; Contraception 9, 615 - 625 (1974)
- SPELLACY, W. N., W. C. BUHI und S. A. BIRK: The effect of the progestogen ethynodiol diacetate on glucose, insulin and growth hormone after six months treatment; Acta endocr. 70, 373 - 384 (1972)
- STAUFFACHER, W. und A. E. RENOLD: Effect of insulin in vitro on diaphragm and adipose tissue of obese mice; Amer. J. Physiol. 216, 98 - 105 (1969)
- STAUFFACHER, W., L. ORCI, D. P. CAMERON, J. M. BUN und A. E. RENOLD: Spontaneous hyperglycemia and/or obesity in laboratory rodents: an example of the possible unusefulness of animal disease models with both genetic and environmental components; Rec. Progr. Horm. Res. 27, 41 - 95 (1971)

- STERN, J. S., P. R. JOHNSON, B. A. BATCHELOR,
L. M. ZUCKER und J. HIRSCH: Pancreatic
insulin release and peripheral tissue
resistance in Zucker obese rats fed high-
and low-carbohydrate diets; Amer. J. Physiol.
228, 543 - 548 (1975)
- SUZUKI, F., Y. DAIKUCHARA, M. ONO und Y. TAKADA:
Studies on the mode of action of insulin:
properties and biological activity of an
insulin-dextran complex; Endocrinology 90,
1220 - 1230 (1972)
- VERMEULEN, A. und M. THIERY: Hormonal contraceptives
and carbohydrate tolerance II. Influence of
medroxyprogesteroneacetate and chronic oral
contraceptives; Diabetologia 10, 253 - 259
(1974)
- YIP, C. C.: Preparation of ^3H -insulin and its
binding to liver plasma membranes; in:
E. FRITZ (Hrsg.): Insulin action, Academic
Press, New York, 1972, pp. 115 - 135
- ZAHN, H., D. BRANDENBURG und D-H. GATTNER:
Molecular basis of insulin action: contribution
of chemical modifications and synthetic
approaches; Diabetes 21, Suppl. 2, 468 - 475
(1972)
- ZIEGLER, R. und E. F. PFEIFFER: Einteilung, Klinik
und Prognose des Diabetes mellitus; in:
E. F. PFEIFFER (Hrsg.): Handbuch des Diabetes
mellitus, Band I, J. F. Lehmanns Verlag,
München, 1969, pp. 417 - 441

7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

<u>Tabellen</u>	Seite
Tab. 1 Ausbeute an Leukozyten und Lymphozyten aus 50 ml Vollblut verschiedener Spezies	47
Tab. 2 Die Bindung der A- und B-Ketten des Insulins an Fettzellen in % der Maximalbindung von Rinderinsulin	52
Tab. 3 Die Bindung von Insulinderivaten und Katzeninsulin an Fettzellen in % der Maximalbindung von Rinderinsulin	53
Tab. 4 Bindung am Rezeptor und an Antikörper, Glukose-Oxydation am Fettgewebe und Blutzuckersenkung insulinähnlicher Verbindungen relativ zum Rinderinsulin	56
Tab. 5 Körpergewicht, Seruminsulin und Blutzucker bei 16 Stunden nüchternen Mäusen mit genetisch bedingter Fettsucht (ob/ob) und normalgewichtigen Kontrollen	58
Tab. 6 Beeinflussung der Blutzucker- und Seruminsulinspiegel nach 13tägiger s.c. Behandlung mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat. Intravenöse Insulinbelastung an 16 Stunden nüchternen weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 180 - 200 g	62
Tab. 7 Blutzucker und Seruminsulin aus gefütterten weiblichen Ratten, die bis zu 36 Tage lang täglich mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat s.c. behandelt worden waren, Körpergewicht 180 - 220 g	64
Tab. 8 Spezifische Insulinbindung an Fettzellen weiblicher Ratten nach 36-tägiger s.c. Behandlung mit 2,5 mg/kg Clomegestonacetat	65

	Seite
Tab. 9 Blutzucker und Seruminsulin aus gefütterten weiblichen Ratten, die bis zu zwölf Tage lang täglich mit 8 mg/kg Clomegestonacetat s.c. behandelt worden waren, Körpergewicht 160 - 200 g	66
Tab. 10 Spezifische Insulinbindung an Fettzellen weiblicher Ratten nach 18-tägiger s.c. Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat	67
Tab. 11 Beeinflussung der Blutzucker- und Seruminsulinspiegel nach 11-tägiger s.c. Behandlung mit 2 mg/kg Cyproteronacetat. Intravenöse Glukosebelastung mit 1 g Glukose/kg an 16 Stunden nüchternen weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 160 - 180 g	70
Tab. 12 Glukose und Insulin im Serum von gefütterten weiblichen Ratten, die bis zu 17 Tage lang täglich mit 2 mg/kg Cyproteronacetat s.c. behandelt worden waren, Körpergewicht 170 - 210 g	71
Tab. 13 Spezifische Insulinbindung an Fettzellen weiblicher Ratten nach 17-tägiger s.c. Behandlung mit 2 mg/kg Cyproteronacetat	73
Tab. 14 Zusammenstellung der biologischen Aktivität in vivo und in vitro, der Bindung am Insulinrezeptor und an Antikörper verschiedener acetylierter Insulinderivate	87

<u>Abbildungen</u>	Seite
Abb. 1 Reagenzglasständer zur Schüttelung von Fettzellen in Eppendorff-Gefäßen	19
Abb. 2 Bindung von Insulin in Abhängigkeit von der Fettzellmenge	34
Abb. 3 Insulinbindung an Fettzellen in Abhängigkeit vom pH	36
Abb. 4 Spezifische Insulinbindung an Fettzellen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei 23°C und 37°C	37
Abb. 5 Reversibilität der Bindung. Nach 90 Minuten Vorinkubation mit markiertem Insulin Verdrängung von nicht markiertem Insulin in Abhängigkeit von der Zeit	38
Abb. 6 Insulinbindung an Fettzellen, Konkurrenzkurve	40
Abb. 7 Spezifische Insulinbindung an Fettzellen in Abhängigkeit von der Konzentration des ¹²⁵ J-Insulins	42
Abb. 8 Die Sättigung der Insulinbindung an Fettzellen	43
Abb. 9 Insulinbindung an Fettzellen, Scatchard-Analyse	45
Abb. 10 Spezifische Insulinbindung an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Insulinkonzentration bei 100×10^6 Zellen/ml	48
Abb. 11 Spezifische Insulinbindung an Lymphozyten in Abhängigkeit von der Zellmenge im Bereich von 10 bis 50×10^6 Zellen/ml	49
Abb. 12 Konkurrenzkurven von vier geprüften Insulinderivaten, A- und B- Ketten des Insulins sowie des Katzeninsulins im Vergleich zum Rinderinsulin	54

Abb. 13	Insulinbindung an Fettzellen genetisch fettsüchtiger Mäuse (ob/ob) und deren Kontrollen (+/+), Kompetitionskurven, Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen, spezifische Bindung bezogen auf das Trockengewicht und auf die Zellzahl	Seite 60
Abb. 14	Insulinbindung an Fettzellen, Kompetitionskurven nach täglicher Behandlung mit 8 mg/kg Clomegestonacetat und entsprechende Kontrollen	68
Abb. 14	Schematische Darstellung der Primärstruktur des Insulins (Rind) und einiger Insulinderivate	84

Herrn Prof. Dr. Dr. E. Gerhards, Herrn Prof.
Dr. K. Graszynski und Herrn Dr. K. Lübke möchte
ich für die Ermöglichung und Förderung meiner
Doktorarbeit danken. Mein besonderer Dank gilt
Herrn Dr. E. Schillinger für die stets entgegen-
kommende Betreuung während der Ausführung
und der Zusammenstellung der Arbeit.

LEBENSIAUF

Als älteste Tochter des Dipl. Ing. Nils Holmberg und seiner Frau Astrid, geborene Sandholm wurde ich, Maria Cecilia Krauth am 21. Januar 1946 in Varkaus/Finnland geboren. 1952 - 1956 besuchte ich die Volksschule und 1956 - 1961 die Realschule meiner Heimatstadt. Danach wechselte ich in das Gymnasium in Grankulla/Finnland über. 1965 bestand ich die Reifeprüfung. Anschließend begann ich mein Studium in Biologie und Chemie auf der Abo Akademie in Abo/Finnland. 1970 legte ich das Examen Kandidat der Naturwissenschaften mit Biologie als Hauptfach ab. Nach der Vermählung mit Dipl. Ing. Günter Krauth und unserem Umzug nach Berlin setzte ich das Studium an der Freien Universität Berlin fort. Im April 1974 bestand ich die Diplomprüfung in Biologie. Im Anschluß daran fing ich in den Forschungslaboratorien der Schering AG, Berlin/Bergkamen mit meiner Dissertation an.

LEBENSLAUF

Als älteste Tochter des Hptl. 1892. Wilh. Heinberg
 und seiner Frau Helwig, geborene Schödel, wurde
 ich, Marie Gertrud Emma am 21. Januar 1892 in
 Varnhagen/Wendland geboren. 1902 - 1908 besuchte
 ich die Volksschule und 1908 - 1910 die Fortbildung-
 in meiner Heimatstadt. Danach wechselte ich an
 das Gymnasium in Osterholz/Wendland über. 1910
 bestand ich die Reifeprüfung. Anschließend begann
 ich mein Studium in Biologie und Chemie an der
 von Akademie in Hannover. 1910 legte ich das
 Examen Kandidat der Naturwissenschaften mit Bio-
 logie als Hauptfach ab. Nach der Versetzung mit
 Hptl. 1892. Oberst Knecht und seiner Frau nach
 Berlin setzte ich das Studium an der Freien Uni-
 versität Berlin fort. Im April 1912 bestand ich
 die Diplomprüfung in Biologie. Im Anschluss daran
 ging ich in den Fortbildungsdienst der
 Abteilung 18, Berlin-Verkehrswesen als meine Dienst-
 station an.

